



HAL
open science

Synthèse et propriétés d'ARNs modifiés en position 2' via des ponts disulfures

Florian Gauthier

► **To cite this version:**

Florian Gauthier. Synthèse et propriétés d'ARNs modifiés en position 2' via des ponts disulfures. Biologie moléculaire. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTTS120 . tel-02356550

HAL Id: tel-02356550

<https://theses.hal.science/tel-02356550>

Submitted on 8 Nov 2019

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ingénierie Biomoléculaire

École doctorale Sciences Chimiques Balard (ED459)

Unité de recherche IBMM UMR 5247 CNRS-UM-ENSCM

Synthèse et propriétés d'ARNs modifiés en position 2' *via* des ponts disulfures

Présentée par Florian GAUTHIER
Le 30 Novembre 2018

Sous la direction de Françoise DEBART

Devant le jury composé de

Jean-Jacques VASSEUR, Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier

Anthony ROMIEU, Professeur, Université de Bourgogne Franche-Comté

Sylvie POCHET, Directrice de recherche CNRS, Institut Pasteur

Benoît MICHEL, Maître de conférences, Université de Nice Sophia Antipolis

Françoise DEBART, Directrice de recherche CNRS, Université de Montpellier

Christelle DUPOUY, Maître de conférences, Université de Montpellier

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse

Encadrante de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Avant-propos

Cette thèse est l'aboutissement de trois années de recherches réalisées à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron, à l'Université de Montpellier, au sein de l'équipe « Oligonucléotides Modifiés ». Ces travaux de recherches ont pu être menés à leur terme grâce au soutien financier de l'Université de Montpellier à travers une bourse MENRT.

Je tiens d'abord à remercier Monsieur Jean-Jacques Vasseur, pour m'avoir accueilli dans son équipe et m'avoir permis d'effectuer ces travaux de thèses dans les meilleures conditions pendant ces trois années.

J'adresse toute ma reconnaissance à Monsieur Anthony Romieu, Professeur à l'Université de Bourgogne Franche-Comté à Dijon, et à Madame Sylvie Pochet, Directrice de Recherche à l'Institut Pasteur, pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je remercie également Monsieur Benoît Michel, Maître de Conférences à l'Université de Nice Sophia Antipolis, pour avoir également accepté de juger ce travail et de siéger dans ce jury.

Je voudrais remercier ma directrice de thèse, Madame Françoise Debart, pour toute l'aide que tu as pu m'apporter durant ces trois années et la confiance que tu as placée en moi. Merci pour tes conseils, ta disponibilité et ta rigueur scientifique qui ont permis de faire de cette thèse ce qu'elle est aujourd'hui.

Je remercie particulièrement mon encadrante de thèse, Madame Christelle Dupouy, pour m'avoir toujours soutenu et encouragé pendant ces trois années, même lorsque tout ne se passait pas comme prévu. Ta disponibilité, nos discussions, tes très nombreuses idées et tes compétences scientifiques m'ont beaucoup aidé, et je suis très heureux d'avoir travaillé à tes côtés.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres de l'équipe, Albert, François, Mickaël, Carine, Guillaume, Marie-Christine et Martine, pour leur bonne humeur, leurs conseils et toutes les discussions que nous avons pu avoir durant ces trois ans.

Je souhaite remercier Monsieur Jean-Rémi Bertrand, pour avoir participé à ce projet et d'avoir permis de compléter le travail effectué.

Merci également à l'ensemble du personnel du laboratoire de Mesures Physiques, et en particulier à Guillaume, pour tout le temps qu'il m'a consacré.

Un grand merci à tous mes camarades de laboratoires. Sonia, Mimouna, Mathieu, Théo, Alejandro et Justine, pour avoir été là depuis le début (ou presque), Rostom, Mégane, Céline, Marie, pour tous les bons moments passés durant cette dernière année. Alex, Maëva, Anthony et Karen, pour toute l'aide que vous avez pu m'apporter au début de cette thèse.

Natacha, Astrid et Crystalle, parce que j'ai été très chanceux que vous fassiez votre stage avec moi.

Je suis également obligé de remercier tous mes amis de l'ENSCM, Paul, Sylvain, Xavier, Max, Camille, Damien, Lucie, Anne, Laura, Anne, Emeline, ... Ces trois ans auraient pu paraître longs sans ces week ends à Chanteuges, Chassagnes, Toulon ou Montpellier et j'espère que ça durera encore très longtemps.

Je dédie ce travail à ma famille, et en particulier à mes parents et ma grand-mère, qui ont toujours cru en moi et ont toujours tout fait pour me soutenir.

Enfin, je remercie particulièrement Laurine, pour son soutien et toute l'aide qu'elle m'a apportée. Cette thèse n'aurait pas été la même sans toi, et je suis extrêmement chanceux de t'avoir à mes côtés.

Sommaire

Sommaire	5
Abréviations	13
Introduction générale	17
1. L'ARN : structure, rôle, outil, modifications	19
1.1. Structure chimique et spatiale	19
1.2. Rôle <i>in vivo</i>	21
1.3. Utilisations thérapeutiques et biotechnologiques des oligonucléotides synthétiques.....	22
1.4. Modifications des ARNs	23
2. Les ponts disulfures dans les acides nucléiques	26
2.1. Intérêt des ponts disulfures	26
2.2. Exemples d'utilisation des ponts disulfures dans les acides nucléiques	27
2.2.1. Ponts S-S au niveau des liens internucléosidiques.....	27
2.2.2. Ponts S-S au niveau des nucléobases	31
2.2.3. Ponts S-S aux extrémités 5' et 3'	35
2.2.3.1. Introduction des fonctions thiols.....	35
2.2.3.2. Applications des ponts disulfures liés aux extrémités 5' et 3'	38
2.2.3.2.1. Conjugaison à des peptides et protéines.....	38
2.2.3.2.2. Conjugaison à des petites molécules non peptidiques	38
2.2.3.2.3. Formation de complexes macromoléculaires	39
2.2.4. Ponts S-S en positions 2' du ribose.....	42
3. Objectifs de la thèse : ARNs modifiés en position 2' par des groupes ou des liens avec des ponts disulfures	42
3.1. Ponts S-S dans des groupements protecteurs en position 2'	42
3.2. Conjugaison à des petites molécules d'intérêt biologique.....	43
3.3. Etude d'ARNs contraints par un lien à pont disulfure intrabrin	45
Chapitre I Synthèse de prodrogues de siARNs modifiées par des groupements 2'-O-benzylthiométhyles (2'-O-BnSSM)	49
Introduction	51

1. Le contexte biologique : l'ARN interférence	51
1.1. Présentation de l'ARN interférence	51
1.2. Mécanisme de l'ARN interférence	52
1.3. Synthèse des siARNs	53
1.4. Applications thérapeutiques et biologiques des siARNs	54
1.5. Limitation des ARNs interférents.....	55
1.6. Approche prodrogue d'ARNs interférents.....	57
2. Modification des ARNs interférents par des groupements biolabiles en position 2' du ribose.....	57
2.1. Oligonucléotides modifiés par des groupements 2'-O-acétalesters et 2'-O-thioacétalesters.....	57
2.2. Oligonucléotides modifiés par des groupements 2'-O-alkyldithiométhyles.....	59
3. Synthèse et évaluation de siARNs mixtes 2'-O-BnSSM / 2'-OH.....	61
3.1. Stratégie de synthèse des ARNs mixtes.....	61
3.1.1. Présentation de la cible biologique	61
3.1.2. Synthèse du réactif benzyldisulfanylpyridine 3	62
3.1.3. Préparation des synthons 2'-O-acétylthiométhyles.....	62
3.2. Choix de la structure des différents ARNs partiellement modifiés	64
3.3. Synthèse des ARNs mixtes 2'-O-BnSSM / 2'-OH	64
3.4. Evaluation des siARNs 2'-O-BnSSM modifiés.....	67
3.4.1. Stabilité thermique des siARNs modifiés	67
3.4.2. Etude de la conformation des siARNs par dichroïsme circulaire	70
3.4.3. Etude de la stabilité des siARNs modifiés en présence de sérum.....	71
3.4.3.1. Etude en sérum humain.....	71
3.4.3.2. Etude en sérum de veau foetal	74
3.4.4. Démasquage des siARNs en présence de glutathion	75
3.4.5. Démasquage des siARNs en extraits cellulaires	78
3.5. Evaluation biologique des différents siARNs sélectionnés	79
3.5.1. Activité en présence d'agents de transfection.....	79
3.5.2. Activité en l'absence d'agents de transfection	81
3.5.3. Evaluation des siARNs avec sept modifications sur le brin sens	83
3.5.3.1. Etude de la toxicité des siARNs.....	83

3.5.3.2. Synthèse des siARNs modifiés marqués avec de la Cy ₃	84
3.5.3.3. Etude de la pénétration cellulaire par microscopie de fluorescence.....	84
4. Conclusion.....	87
5. Partie expérimentale	89
Chapitre II : Co-délivrance de siARNs et de doxorubicine conjugués <i>via</i> un lien auto-immolable contenant des ponts disulfures	101
Introduction	103
1. Présentation des systèmes de co-délivrance de la doxorubicine et de siARNs	104
1.1. Caractéristiques de la doxorubicine	104
1.2. Vectorisation de la doxorubicine	105
2. Présentation des liens auto-immolables.....	109
3. Préparation des ARNs conjugués à la doxorubicine	113
3.1. Principe	113
3.2. Stratégie de synthèse.....	114
3.3. Synthèse des précurseurs au couplage.....	115
3.3.1. Synthèse de la doxorubicine modifiée par un lien éthylbis(disulfanyl)pyridine .	115
3.3.2. Synthèse des différents liens alkylbis(disulfanyl)pyridine.....	116
4. Synthèse et évaluation des siARNs liés à la doxorubicine	117
4.1. Synthèse d'ARNs portant des liens contenant un groupement alkylbis(disulfanyl)pyridine	117
4.1.1. Mise au point de la synthèse des ARNs modifiés par un lien alkylbis(disulfanyl)pyridine.....	118
4.1.2. Synthèse des ARNs 26 à 29 porteurs de liens alkylbis(disulfanyl)pyridine) ..	120
4.2. Synthèse des ARNs conjugués à la doxorubicine.....	121
4.2.1. ARNs conjugués à une molécule de doxorubicine	121
4.2.2. ARN conjugué à deux molécules de doxorubicine	126
4.2.2.1. Synthèse d'un ARN modifié en deux positions par des liens 2'-O-PySSMBnSSM.....	126
4.2.2.2. Conjugaison en solution de l'ARN aux deux molécules de doxorubicine	127
4.3. Evaluation des siARNs conjugués à la doxorubicine	129
4.3.1. Stabilité thermique des siARNs conjugués à la doxorubicine	129
4.3.2. Etude de la conformation par dichroïsme circulaire	130

4.3.3. Etude de la stabilité en présence de sérum humain	131
4.4. Devenir des ARNs liés à la doxorubicine en milieu réducteur	132
5. Conclusion	134
6. Partie expérimentale	135
Chapitre III : Conjugaison d'ARNs à des biomolécules <i>via</i> un lien <i>N</i>-disulfanyléthylcarbamate en position 2' de l'uridine	141
Introduction	143
1. Choix des biomolécules à conjuguer.....	144
1.1. Glucose et galactose	144
1.2. Acide désoxycholique	145
1.3. Coumarine.....	146
1.4. Biotine	147
2. Stratégie de synthèse des ARNs précurseurs	147
2.1. Conjugaison de petites molécules actives sur des oligonucléotides.....	147
2.2. Présentation des stratégies de synthèse	150
2.3. Préparation du synthon 2'-O-(2-(acétylthio)-éthylaminocarbonyl) uridine phosphoramidite 36	152
2.4. Synthèse des ARNs modifiés 2'-O-PySSEAC.....	153
3. Conjugaison en solution des biomolécules	155
3.1. Mise au point des conditions de couplage en solution	155
3.1.1. Méthode A : Couplage direct.....	156
3.1.2. Méthode B : Couplage en deux étapes	159
3.1.2.1. Introduction d'une fonction disulfanylpyridine sur les biomolécules ne contenant pas de groupement thiol.....	159
3.1.2.1.1. Synthèse du dérivé aminoéthylsulfanylpyridine 47	159
3.1.2.1.2. Synthèse du dérivé S-S-pyridine de la biotine 48	159
3.1.2.1.3. Synthèse du dérivé S-S-pyridine de l'acide désoxycholique 49	160
3.1.2.2. Réactions de couplage	161
3.2. Stabilité des ARNs en présence des biomolécules	164
3.3. Synthèse d'un ARN conjugués avec deux biomolécules.....	166
3.3.1. Synthèse d'un ARN contenant deux uridines 2'-O-PySSEAC.....	167
3.3.2. Couplage en solution des biomolécules	168

4. Devenir des ARNs conjugués en présence de glutathion	171
5. Bilan des méthodes de conjugaison	174
6. Conclusion	176
7. Partie expérimentale	177
Chapitre IV : Synthèse d'ARNs contraints par un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents	187
Introduction	189
1. Présentation des hairpins ARN	189
1.1. Structure des hairpins	189
1.2. Rôle des hairpins ARNs	190
1.3. Applications biologiques	190
2. Intérêt des oligonucléotides contraints pour des études structurales	192
2.1. Introduction de contraintes structurales dans les hairpins	192
2.2. Introduction de modifications contenant des ponts disulfures	193
2.2.1. Ponts disulfures dans des doubles brins	193
2.2.2. Ponts disulfures introduits dans des hairpins	194
3. Incorporation du lien diméthylène disulfure dans un duplex	196
3.1. Synthèse d'un ARN contenant un lien diméthylène disulfure entre deux uridines adjacentes	196
3.2. Etude de la stabilité thermique de duplex ARN / ARN et ADN / ARN formés avec l'ARN modifié 56	198
4. Incorporation du lien diméthylène disulfure dans une boucle homouridine d'hairpins ARNs modèles	198
4.1. Synthèse des hairpins ARNs modèles	199
4.2. Etudes structurales des hairpins modifiées	201
4.2.1. Stabilité thermique des hairpins modèles modifiées	201
4.2.2. Etude de la conformation des hairpins par dichroïsme circulaire	204
4.3. Stabilité enzymatique des hairpins modèles H4 et H5 modifiées	205
5. Incorporation du lien diméthylène disulfure dans la partie boucle de la séquence HIV-1 DIS	207
5.1. Synthèse des ARNs DIS modifiés	207
5.2. Etude structurale de la transition hairpin-duplex de l'ARN DIS	209
5.2.1. Stabilité thermique des ARNs DIS modifiés	209

5.2.2.	Etude de la conformation par dichroïsme circulaire	212
5.3.	Stabilité enzymatique des DIS modifiés	212
6.	Application en fluorescence des DIS modifiés par le lien diméthylène disulfure comme « molecular beacon »	213
6.1.	Principe	213
6.2.	Synthèse d'un ARN DIS-2F modifié par un lien diméthylène disulfure portant un marqueur fluorescent et un « quencher » aux extrémités 5' et 3'	214
6.3.	Validation du modèle en présence de TCEP	215
6.4.	Détermination de la limite de détection de glutathion	217
6.4.1.	Méthode 1 : Méthode de la déviation standard	219
6.4.2.	Méthode 2 : Méthode des blancs	220
6.4.3.	Comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes utilisées	222
7.	Conclusion	223
8.	Partie expérimentale	225
	Conclusion générale	231
	Bibliographie	237
	Annexes	265

Abréviations

A : adénosine	CPG : controlled-pore glass
Ac : acétyle	Cy3 : cyanine 3
ACN : acétonitrile	DAPI : 4',6',diamidino-2-phénylindole
AcOM : acétyloxyméthyle	DBU : 1,8-Diazabicyclo[5.4.0.]undéc-7-ène
AcSEAC : 2-(acétylthio)-éthylaminocarbonyle	DC : dichroïsme circulaire
AcSM : acétylthiométhyle	DCM : dichlorométhane
ADN : acide désoxyribonucléique	DIEA : diisopropyléthylamine
AMEBuOM : 2-aminométhyl-2-éthylbutyryloxyméthyle	DMF : diméthylformamide
AMProm : 2-amino-2-méthylpropionyloxyméthyle	DMSO : diméthylsulfoxyde
APBuOM : 2-amino-2-phénylbutyryloxyméthyle	DMTr : diméthoxytrityle
ARN : acide ribonucléique	DOX : doxorubicine
ARNdb : ARN double brin	DTT : dithiothréitol
ARNi : ARN interférence	ESI : electrospray ionisation
ARNm : ARN messenger	F-ANA : fluoro-β-D-arabinonucleic acid
ARNr : ARN ribosomal	FAM : fluorescéine
ARNt : ARN de transfert	FBS : fetal bovine serum
BMT : 5-benzylmercaptotétrazole	G : guanosine
BnSSM : benzylthiométhyle	GalNAc : N-acétylgalactosamine
BuOM : butyryloxyméthyle	GMEBuOM : 2-guanidinométhyl-2-éthylbutyryloxyméthyle
C : cytidine	GSH : glutathione
CCM : chromatographie sur couche mince	HIV-1 DIS : human immunodeficiency virus -1 dimerization initiation site
CNE : cyanoéthyle	HPLC : high-performance liquid chromatography
	HRMS : high resolution mass spectrometry

Abréviations

iBuOM : isobutyryloxyméthyle	PySSPSSM : 5-(pyridin-2-yl)disulfanyl)pentyl)disulfanyl)méthyle
IEX : ion exchange	RGD : arginine – glycine – acide aspartique
LCAA : long chain alkyl amine	RISC : RNA-induced silencing complex
LNA : locked nucleic acid	RMN : résonance magnétique nucléaire
LoB : limite de blanc	RP : reversed-phase
LoD : limite de détection	RSSM : alkyl dithiométhyle
MALDI-TOF : matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight	RT-qPCR : reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
MDMT : méthyl dithiométhyle	siARN : small interfering RNA
Me : méthyle	SAc : thioacétyle
MeOH : méthanol	S-S : disulfure
miARN : microARN	S-SPy : disulfanylpyridine
MOE : méthoxyéthyle	shARN : short hairpin ARN
MTM : méthylthiométhyle	SVF : serum de veau foetal
ON : oligonucléotide	SVPDE : snake venom phosphodiesterase
PAC : phénoxyacétyle	T : thymidine
PBS : phosphate buffered saline	TBE : Tris borate EDTA
PEI : polyéthylèneimine	TCA : acide trichloroacétique
PiBuOM : phényl isobutyryloxyméthyle	TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phosphine
PivOM : pivaloyloxyméthyle	TEAAc : acetate de triéthylammonium
PivSM : pivaloylthiométhyle	THF : tétrahydrofurane
PO : phosphate	TIPS : tétraisopropyl disiloxane
PrOM : propionylloxyméthyle	TLC : thin layer chromatography
PS : phosphorothioate	T_m : température de fusion
Py : pyridine	U : uridine
PySSEAC : (pyridin-2-yl)disulfanyl)-éthylaminocarbonyle	UV : ultra-violet
PySSMBnSSM : 4-((pyridin-2-yl)disulfanyl)méthyl)benzyl)disulfanyl)méthyles	

Introduction générale

1. L'ARN : structure, rôle, outil, modifications

1.1. Structure chimique et spatiale

L'ARN ou acide ribonucléique est un polymère de ribonucléotides (adénosine A, cytidine C, guanosine G et uridine U), qui se composent d'un sucre (le ribose), d'un phosphate, et des nucléobases adénine, cytosine, guanine et uracile. (**Figure 1A**). L'ARN est présent dans les cellules procaryotes et eucaryotes, ainsi que chez certains virus (virus à ARN), pour lesquels il s'agit du seul matériel génétique. Il est généralement sous forme de simples brins dans la cellule (sauf chez certains virus où il se présente en double brin) et est nettement plus court que l'ADN du génome.

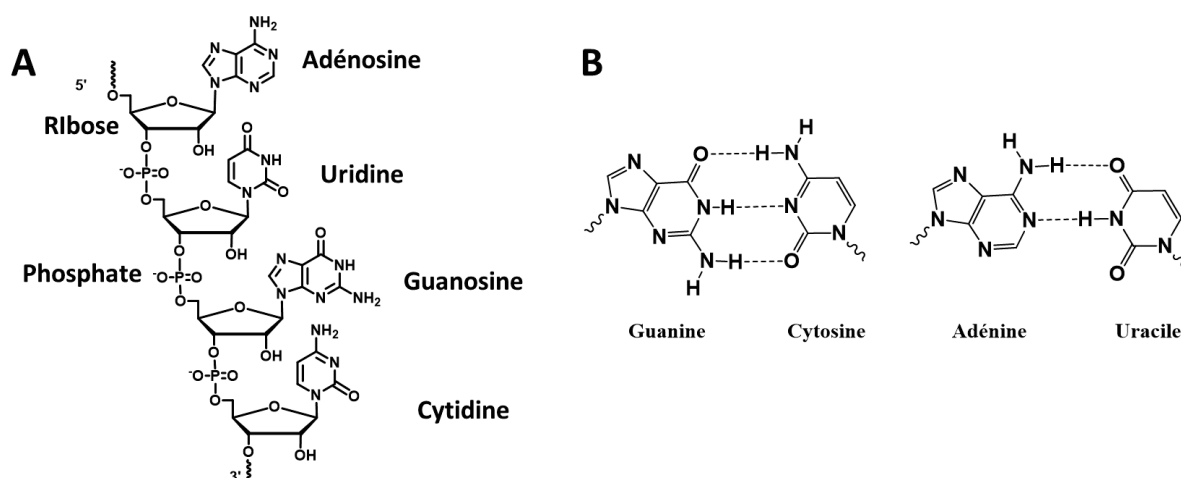


Figure 1 : Structure primaire de l'ARN (A) et appariement des bases de type Watson-Crick (B)

La principale différence de structure avec l'ADN est la présence d'une fonction hydroxyle (OH) en position 2' du ribose. Elle induit pour l'ARN la conformation du cycle furanose du ribose en position C3'-*endo* (forme nord) alors que pour l'ADN, le désoxyribose adopte une conformation C2'-*endo* (forme sud) (**Figure 2**). L'ARN s'organise en une structure secondaire en double hélice de conformation A, par des appariements de types Watson-Crick¹ entre les bases (**Figure 1B**), différente de la conformation B préférée par l'ADN. Le diamètre de l'hélice A est plus grand (26 Å) que celui de l'hélice B (20 Å), et le grand sillon est profond et très étroit contrairement au petit sillon qui devient très large et donc accessible.

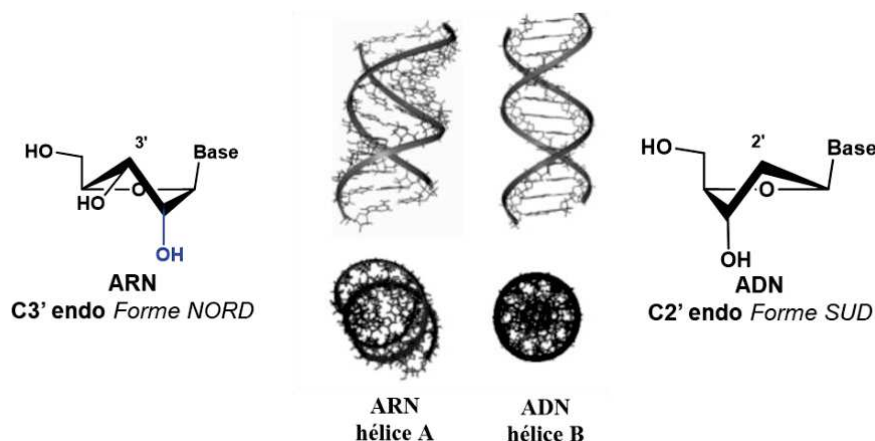


Figure 2 : Hélice A de l'ARN et hélice B de l'ADN
(structure des hélices issue de *Chem Soc Rev* **2001**, 30 (1), 70-81²)

Les appariements internes entre bases complémentaires d'un ARN simple brin contenant des séquences palindromiques (auto-complémentaires) engendrent d'autres structures secondaires, qui se composent de régions appariées en hélice (tiges) et de régions non-appariées (boucles). Il s'agit en particulier des structures en épingle à cheveux (« hairpins » ou tige-boucle), boucles « bulges » ou encore des jonctions (**Figure 3**). Ces différents motifs de structures secondaires sont notamment présents dans les ARNs ribosomiques et les ARNs de transfert. Au-delà de ces structures, un ARN peut, comme les protéines, adopter une structure tertiaire par des interactions à distance, engendrant des propriétés particulières telles que la catalyse de réactions chimiques dans le cas des ribozymes.

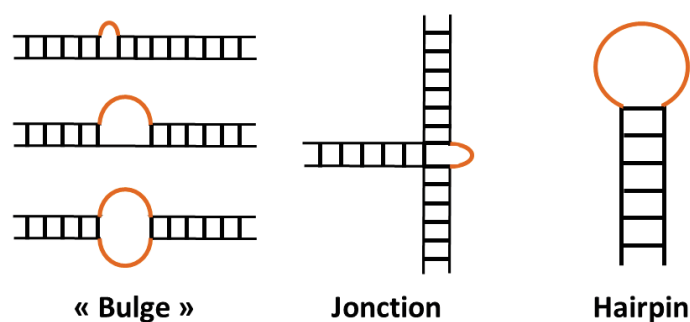


Figure 3 : Exemples de structures secondaires d'ARN

D'un point de vue chimique, il est important de souligner qu'une deuxième conséquence de la présence de l'hydroxyle en 2' du ribose est une plus grande fragilité de l'ARN vis-à-vis de l'hydrolyse chimique, en comparaison avec l'ADN. Les liaisons phosphodiesteres de l'ARN sont rapidement hydrolysées en milieu alcalin et dans les milieux biologiques. Ainsi, la durée de vie d'un ARN est beaucoup plus courte que celle d'un ADN.

1.2. Rôle *in vivo*

L'ARN remplit diverses fonctions et joue un rôle essentiel dans la voie d'expression des gènes, par laquelle l'information génétique codée dans l'ADN est traduite en protéines, nécessaires aux cellules pour leur fonctionnement et leur développement. Pour réguler cette expression ou développer des activités catalytiques, différents types d'ARNs remplissent des fonctions variées :

- Les ARNs messagers (ARNm), synthétisés par une ARN polymérase à partir de l'ADN. Ils sont le support temporaire de l'information génétique avant leur traduction en protéines par les ribosomes (**Schéma 1**).

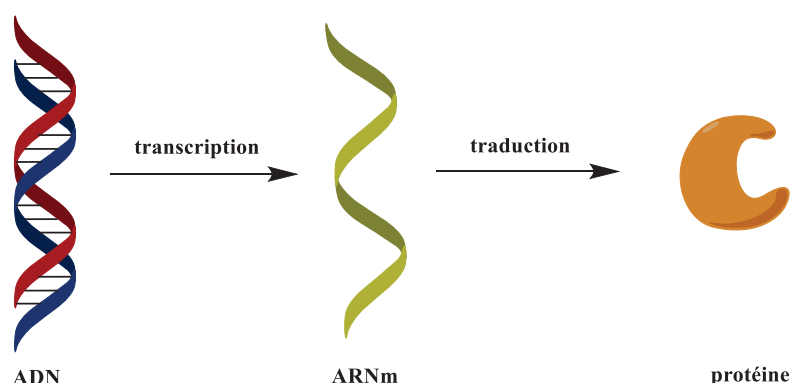


Schéma 1 : Représentation simplifiée de la biosynthèse des protéines à partir de l'ADN *via* l'ARNm

- Les ARNs ribosomiques (ARNr) qui, associés à des protéines, constituent les ribosomes, ces derniers étant les principaux acteurs de la synthèse des protéines.
- Les ARNs de transfert (ARNt), impliqués dans le transfert des acides aminés vers les ribosomes lors de la traduction des ARNm en protéines. Ils possèdent une structure secondaire caractéristique, en forme d'une « feuille de trèfle », composée de quatre tiges appariées, avec à leur extrémité des boucles non appariées (**Figure 4**).

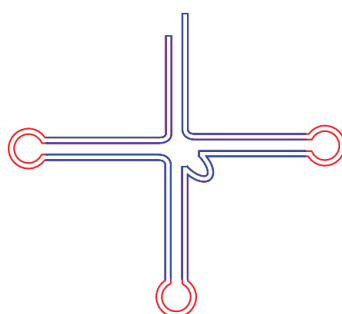


Figure 4 : Structure d'un ARNt

- Les ARNs catalytiques, ou ribozymes, qui sont des enzymes constituées d'acides nucléiques. Leur structure tertiaire très définie leur permet de former des sites de reconnaissance de ligands, sur lesquels une réaction chimique est catalysée.

- Les ARNs guides, tels que les microARNs (miARN), qui s'associent à des enzymes pour guider leur action sur des ARNs de séquence complémentaire. Ils interviennent dans le processus d'ARN interférence qui sera détaillé dans le chapitre I de ce manuscrit, en s'associant au complexe protéique RISC pour dégrader les ARNm cibles auxquels ils s'apparient, inhibant ainsi leur traduction en protéines.
- Les ARNs régulateurs de l'expression génétique, qui modulent la capacité d'un ARNm complémentaire à se fixer au ribosome par appariement, aboutissant à une régulation de la traduction des gènes.

De par ces multiples fonctions, l'ARN est une molécule très polyvalente, et constitue donc une cible de choix pour être lié à des petites molécules ou à des oligonucléotides synthétiques, par complémentarité des bases, afin de moduler l'expression des gènes.

1.3. Utilisations thérapeutiques et biotechnologiques des oligonucléotides synthétiques

Les oligonucléotides synthétiques font l'objet d'un grand intérêt depuis plusieurs décennies. Leurs applications se sont en particulier développées dans les domaines du diagnostic et de la thérapie, majoritairement pour inhiber spécifiquement l'expression de gènes. Les ARNm sont généralement la cible des oligonucléotides synthétiques, grâce à leur capacité à se fixer à des brins complémentaires. Cette association permet l'étude des activités cellulaires par le blocage de l'expression de protéines cibles.

Deux principales classes d'oligonucléotides sont généralement utilisées :

- les oligonucléotides antisens, permettant l'hybridation d'un court ADN synthétique avec un ARNm complémentaire spécifique pour bloquer sa traduction en protéine *via* la création d'un duplex mixte ARN / ADN. Ce dernier est substrat de l'enzyme RNase H, entraînant la coupure de l'ARN messager ciblé.³
- les ARNs interférents, de courts fragments d'ARNs pouvant s'associer avec des ARNm pour en inhiber la traduction par ARN interférence. Ils se présentent sous la forme de miARNs, des ARNs simples brins, ou de « small interfering ARNs » (siARNs), des ARNs doubles brins. Les siARNs synthétiques ont fait l'objet de recherches approfondies par notre équipe au cours des dernières années. Leurs caractéristiques et leur mécanisme d'action seront détaillés dans le chapitre I.⁴

L'avancée des découvertes dans le domaine des acides nucléiques a fait émerger beaucoup d'espoirs. Par exemple, les développements récents de CRISPR-Cas9, qui ont augmenté de façon exponentielle ces dernières années⁵, représentent un nouveau domaine d'application des oligonucléotides synthétiques, avec des ARNs simples brins de séquence prédéterminée servant de guides pour l'édition de l'ADN dans les cellules.⁶ La recherche

thérapeutique est un autre axe majeur de recherche. Les pathologies issues d'une expression anormale de gènes ou d'une activité virale sont des candidates de choix pour des thérapies basées sur des acides nucléiques. Néanmoins, un faible nombre d'oligonucléotides a dépassé le stade des essais cliniques, en raison de résultats pharmacocinétiques et pharmacodynamiques défavorables⁷ et de problèmes de toxicité.⁸

Malgré ces difficultés, plusieurs oligonucléotides modifiés ont tout de même atteint les phases cliniques.⁹ En 1999, un premier oligonucléotide, le Fomivirsén, développé par la société Isis Pharmaceuticals, a reçu une autorisation de mise sur le marché par la FDA. Il est basé sur une stratégie antisens utilisant des phosphorothioates et sert au traitement des rétinites virales causées par un cytomégalovirus.¹⁰ D'autres composés antiviraux font actuellement l'objet de tests cliniques.¹¹ Les cancers sont également des cibles attractives, dans le but de traiter les causes génétiques de la maladie. Les drogues anticancéreuses sont connues pour avoir des effets secondaires toxiques notables, rendant l'utilisation des oligonucléotides très intéressante pour réduire les doses utilisées. Plusieurs oligonucléotides antisens font ainsi l'objet de développements cliniques.¹² Récemment, un premier siARN a reçu une autorisation de mise sur le marché, pour le traitement de l'amylose de la transthyrétine. Cette maladie est due à une mutation sur le gène TTR codant pour la transthyrétine, aboutissant à une forme mutée qui s'accumule dans des dépôts amyloïdes. Deux siARNs visant à bloquer l'expression de cette forme mutée ont été développés par Alnylam Pharmaceuticals¹³, et l'un d'eux, le patisiran (ONPATTRO™), portant des modifications 2'-OMe et encapsulé dans des nanoparticules lipidiques, a été accepté en juillet 2018.^{9b, 14}

A l'heure actuelle, le développement de ces oligonucléotides thérapeutiques s'est avéré plus compliqué que ce que les espoirs initiaux laissaient entrevoir en raison des problèmes d'adressage, de biodistribution, de stabilité ou de pénétration cellulaire. Comme pour d'autres techniques par le passé, plusieurs années ont été nécessaires avant d'obtenir de premiers résultats positifs. Ainsi, les différents exemples précurseurs présentés sont actuellement suivis par plus d'une dizaine de composés en phases cliniques.^{9b} Plusieurs stratégies ont été mises en place pour remédier aux différentes limitations des oligonucléotides, telles que la modification de leur structure chimique ou leur couplage à des composés permettant de moduler leurs propriétés, afin d'augmenter leur efficacité et limiter leur toxicité.¹⁵ L'avantage est la synergie entre les propriétés chimiques intrinsèques des oligonucléotides et celles des molécules fixées, donnant ainsi accès à un grand nombre de nouveaux composés différents.¹⁶

1.4. Modifications des ARNs

La structure chimique des oligonucléotides permet d'envisager plusieurs sites pour introduire des modifications : sur les bases, sur les liens internucléosidiques, aux extrémités 5' et 3' ou encore en position 2' du sucre (**Figure 5**).

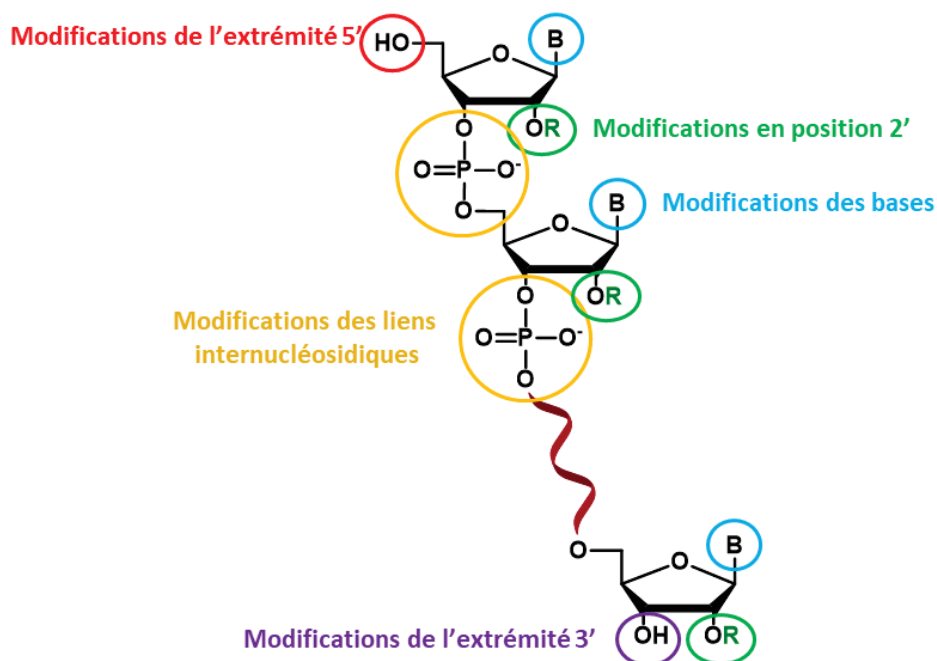


Figure 5 : Sites de modifications des oligoribonucléotides

Depuis plus de trois décennies, de nombreuses modifications chimiques d'oligonucléotides ADNs ou ARNs ont été proposées. Cependant, seules quelques-unes ont été introduites dans les oligonucléotides thérapeutiques, validant les critères requis pour en faire des médicaments efficaces. Les modifications décrites dans la littérature ne seront pas présentées de manière exhaustive, mais nous aborderons des exemples régulièrement utilisés dans des oligonucléotides.

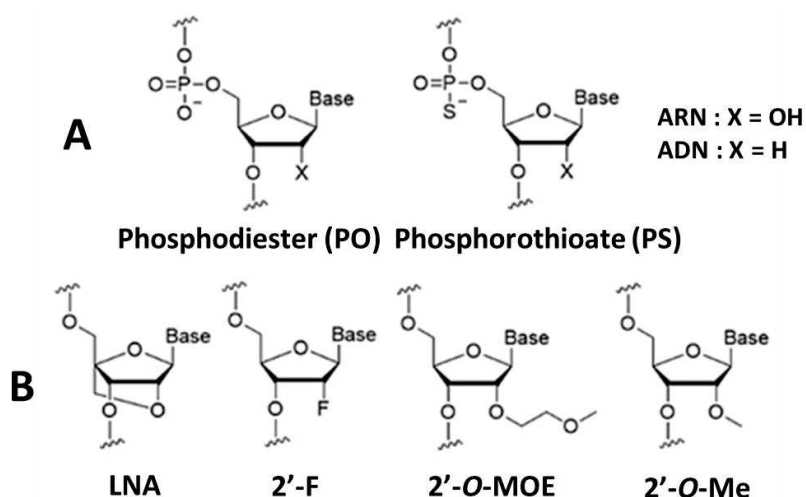


Figure 6 : Exemples de modifications chimiques d'oligonucléotides
(Figure adaptée de *Nucleic Acids Res* 2018, 46 (4), 1584-1600^{9b})

En particulier, le remplacement d'un atome d'oxygène non-pontant du lien phosphodiester par un atome de soufre, pour donner un lien phosphorothioate (PS), constitue la modification la plus largement utilisée dans le développement des drogues à base d'acides

nucléiques (**Figure 6A**). Le lien PS augmente la stabilité vis-à-vis des nucléases et la fixation aux protéines sériques, avec pour conséquence une protection plus efficace des oligonucléotides en circulation, laissant plus de temps aux tissus cibles pour les absorber.

Les modifications au niveau du ribose sont très répandues, et en particulier le remplacement du 2'-hydroxyle par de nombreux groupements différents. Les plus utilisées dans le domaine thérapeutique sont le 2'-*O*-méthyle (2'-*O*-Me), le 2'-*O*-méthoxyéthyle (MOE) et le 2'-fluoro (**Figure 6B**).^{9b, 17} Leur utilisation dans le cadre des siARNs sera abordée plus en détail dans le chapitre I. L'objectif de ces modifications en 2' du ribose est d'augmenter la stabilité enzymatique et/ou thermique, en particulier après hybridation avec une séquence complémentaire, permettant l'utilisation d'oligonucléotides plus courts et plus simples à synthétiser. De plus, l'atome d'oxygène en 2' peut aussi être lié à l'atome de carbone en 4', formant des acides nucléiques contraints comme les LNA (locked nucleic acid), caractérisés par un pont 2',4'-méthylène.¹⁸ Un seul nucléotide contraint dans une séquence est suffisant pour augmenter la stabilité du duplex de façon significative (5 à 10 °C), ce qui a par exemple permis d'envisager des LNAs de seulement 13 nucléotides de long ciblant une lipoprotéine comme candidats aux essais cliniques.¹⁹

L'objectif recherché par la modification des nucléobases est d'augmenter la stabilité des duplex, tout en maintenant et améliorant la reconnaissance et l'appariement des paires de bases. Ces modifications sont moins utilisées que celles sur le lien internucléosidique et le ribose en 2' mais certaines, telles que la 5-bromo, 5-iodo, 2-thio, 4-thio, dihydro ou pseudo-uracile sont néanmoins intéressantes par exemple.

Les hydroxyles aux extrémités 5' et 3' des oligonucléotides sont des sites très favorables à la conjugaison, en raison de leur liberté et leur réactivité. Par exemple, des biomolécules hydrophobes d'origine lipidique ont été conjuguées à des oligonucléotides pour améliorer leur délivrance dans les cellules. La modification la plus largement rencontrée est la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc), favorisant un adressage ciblé des hépatocytes *via* la reconnaissance du récepteur de l'asialoglycoprotéine. L'internalisation et l'inhibition de gènes ont ainsi été améliorées sans avoir recours à des nanoparticules.²⁰ Des conjugués de GalNAc avec des oligonucléotides antisens ont également été utilisés pour augmenter la délivrance, aboutissant à des résultats prometteurs.

Après avoir montré au travers de quelques exemples comment les différents constituants des oligonucléotides pouvaient être modifiés, nous décrivons dans les quatre chapitres de ce manuscrit notre travail, focalisé sur la **modification de la position 2' des ARNs** par divers groupes ou liens contenant **un pont disulfure**. Nous expliciterons le choix du pont disulfure en rappelant ses propriétés, et l'intérêt de son utilisation dans le domaine des acides nucléiques pour des applications variées.

2. Les ponts disulfures dans les acides nucléiques

2.1. Intérêt des ponts disulfures

La liaison disulfure S-S est présente communément dans la nature, contribuant de manière significative à la structure tertiaire et à la stabilité des protéines extracellulaires. Elle est formée par le couplage oxydatif de deux fonctions thiols (R-SH). Plusieurs méthodes ont été utilisées pour construire des liaisons soufre-soufre (S-S), notamment par oxydation d'un thiol en utilisant l'oxygène ambiant, des métaux ou du H₂O₂ par exemple.²¹ Une autre méthode très fréquemment utilisée est l'utilisation de la réaction d'échange thiol-disulfure, une réaction S_N2 réversible impliquant la coupure et la formation d'un lien covalent S-S (**Schéma 2**).²² La fonction thiol R-SH, avec un pKa compris entre 9 et 10, est aussi présente sous forme de thiolate (RS⁻) en solution aqueuse en fonction du pH, et cet anion est un nucléophile plus réactif que le thiol.

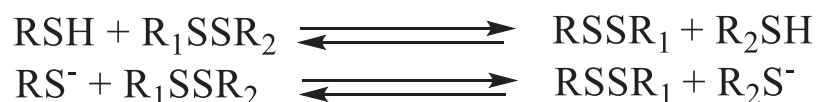


Schéma 2 : Réaction d'échange thiol-disulfure

Les ponts disulfures existent dans des équilibres dynamiques en présence de thiols et de thiolates. Il s'agit d'un processus connu pour altérer la structure secondaire des protéines, couramment exploité en chimie combinatoire dynamique pour générer de nouveaux ligands et récepteurs.

Les liens disulfures sont stables en milieu extracellulaire et instables dans le cytosol en raison de l'environnement réducteur présent dans les compartiments intracellulaires. Ce milieu réducteur s'explique par la présence de glutathion (**Figure 7**), contenant une fonction thiol, à des concentrations de l'ordre de 1 à 10 mM, entraînant la coupure du pont disulfure.

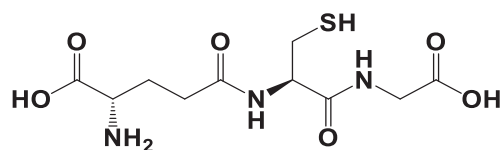


Figure 7 : Structure du glutathion

Les ponts disulfures ont été très largement utilisés, par exemple pour lier des toxines ou des drogues à des anticorps, ou créer des systèmes favorisant la délivrance de composés dans les cellules.^{21, 23} De plus, il est connu que la concentration en GSH est plus élevée dans les cellules tumorales hypoxiques, ce qui est un avantage pour leur utilisation pour le traitement de tumeurs.²⁴ Ils servent aussi de sondes chimiques, notamment pour la détection de molécules contenant des thiols²⁵ ou de métaux, en particulier le mercure.²⁶ Leur intérêt a

en outre été démontré dans le domaine thérapeutique, pour former des nanoparticules, des hydrogels ou des prodrogues de produits actifs.^{25e}

De multiples applications de ces liaisons biocompatibles ont été imaginées dans le domaine des acides nucléiques. Nous en donnerons quelques exemples pour illustrer l'intérêt de cette liaison dynamique.

2.2. Exemples d'utilisation des ponts disulfures dans les acides nucléiques

Dans ce paragraphe, les exemples de ponts disulfures introduits dans les acides nucléiques et leurs applications seront présentés en fonction de leur positionnement sur les liens internucléosidiques, les bases, les extrémités ou le sucre.

2.2.1. Ponts S-S au niveau des liens internucléosidiques

Le squelette classique des oligonucléotides se compose de nucléosides liés par leurs extrémités 5' et 3' par des liens phosphodiester. Plusieurs exemples les remplaçant par un lien disulfure ont été rapportés, pour des applications variées.

Une première application est la **ligation de deux fragments d'ADNs** par formation d'un pont disulfure entre leurs extrémités grâce à une réaction d'échange thiol-disulfure.²⁷ L'association à un brin guide, servant de matrice, d'un ADN modifié à son extrémité 5' par un lien contenant un acide mercaptophénylacétique, et d'un autre ADN modifié à son extrémité 3' par une *tert*-butyldisulfanyl cystéine, par appariement des bases selon Watson-Crick¹, met à proximité le thiol et le pont disulfure.²⁸ Cette proximité entraîne la formation du pont disulfure entre les deux ADN avec des rendements supérieurs à 80% (**Schéma 3**).

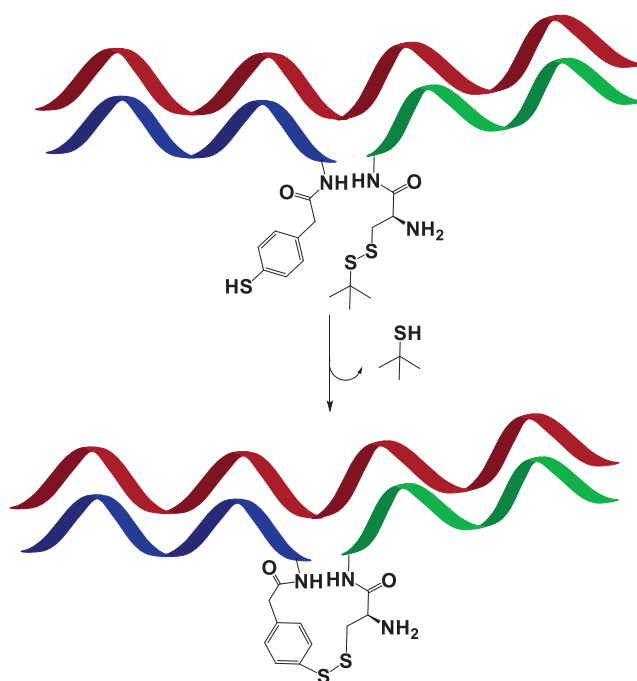


Schéma 3 : Ligation guidée d'ADNs par des ponts disulfures

Le **remplacement du lien phosphodiester** par un pont disulfure est également possible directement entre les extrémités 5' et 3' respectives de deux fragments d'ADNs, sans lien espaceur. Pour former ce pont disulfure, l'équipe de V. Patzke a synthétisé un ADN modifié en 5' par un thiol et un ADN modifié en 3' par un pont disulfure activé par un dérivé du réactif d'Ellman (acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)) comportant un « quencher » (DABCYL) (**Schéma 4**).²⁹ Les études par modélisation moléculaire ont mis en évidence que ce remplacement n'engendre qu'une faible déformation de l'hélice d'ADN.

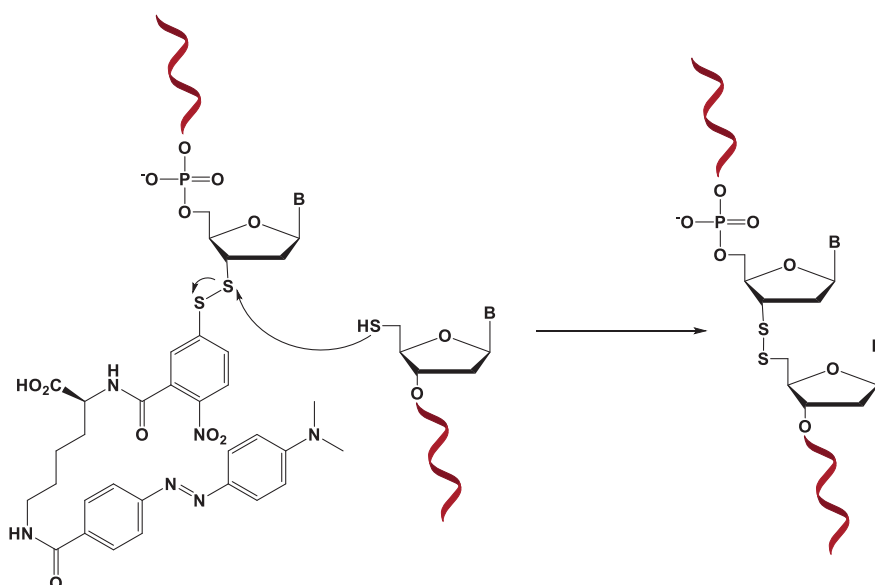


Schéma 4 : Ligation entre deux oligonucléotides par un pont disulfure internucléosidique

Une autre approche consiste à incorporer, lors de la synthèse de l'oligonucléotide, un phosphoramidite d'un dinucléotide lié entre les positions 5' et 3' par un pont disulfure. L'équipe de K. Gothelf a ainsi synthétisé un dinucléotide de thymidine (**Figure 8**), incorporé par la suite dans différents oligonucléotides en utilisant la méthode aux phosphotriesters.³⁰ Des analyses par électrophorèse de l'ADN modifié, associé à un brin complémentaire ont montré une seule bande, mettant en évidence la formation du duplex. En revanche, en présence d'agents réducteurs, deux bandes correspondant à des espèces plus courtes sont observées, correspondant à la coupure du pont disulfure produisant deux fragments séparés. De plus, la reconnaissance par une ADN polymérase n'a pas été impactée, permettant la réplication malgré un taux légèrement plus élevé de mutations détectées, indiquant la biocompatibilité de cette liaison disulfure.

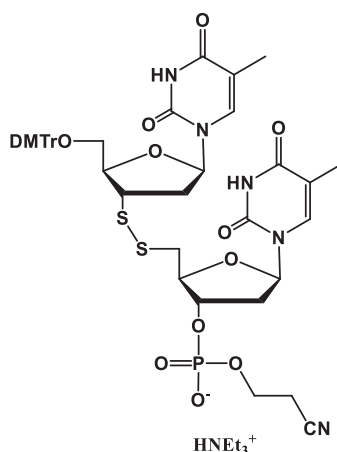


Figure 8 : Structure du dinucléotide 3'-5' disulfure

Bien que remplacer complètement les liens internucléosidiques soit possible, une autre alternative est de les **modifier**³¹, pour pallier la dégradation enzymatique, puisqu'il s'agit du site de coupure des nucléases, et à la faible pénétration cellulaire, limitée à cause des charges négatives sur les phosphates.³² Leur modification a ainsi pour but d'améliorer ces propriétés.

Une première approche pour introduire des thiols est d'utiliser des phosphoramidates. Un H-phosfonate introduit sur l'oligonucléotide a été converti en phosphoramidate par réaction avec la cystamine (**Schéma 5A**).³³ Cette dernière a ensuite permis, après réduction en thiol, de **lier deux brins d'un duplex ADN (Schéma 5B)**.³⁴ L'équipe de T. Majima a modifié un brin auto-complémentaire avec un phosphoramidate portant des liens diamines disulfures de longueurs variables.³⁵ Après association des deux brins par auto-complémentarité, les ponts disulfures ont été coupés avec du dithiothréitol (DTT), libérant deux thiols qui ont ensuite formé le pont disulfure entre les deux brins. L'étude biophysique de ces interconnexions ou « **cross-links** » a révélé une forte influence de la stéréochimie des phosphoramidates. Deux diastéréoisomères ont été isolés, et uniquement l'un des deux a démontré une augmentation de la stabilité thermique résultant de la formation d'un duplex stabilisé.

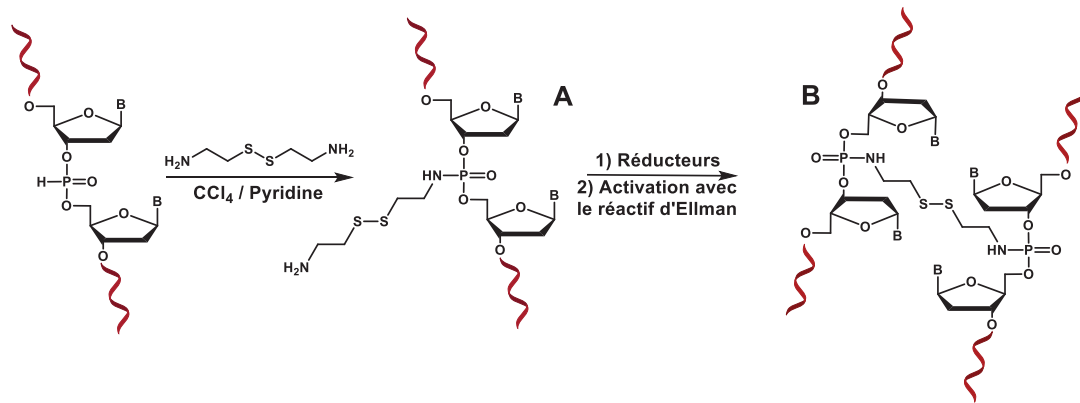


Schéma 5 : Synthèse du phosphoramidate portant une cystamine (A), permettant d'effectuer des réactions de conjugaison entre brins auto-complémentaires (B)

Enfin, les phosphorothioates sont des cibles naturelles pour le couplage *via* des ponts disulfures en raison de leur structure. La réaction entre deux phosphorothioates situés aux extrémités de deux ADNs distincts, avait été décrite en 1993 par S. Gryaznov et R. Letsinger grâce à l'appariement à un ADN guide (**Schéma 6**).³⁶

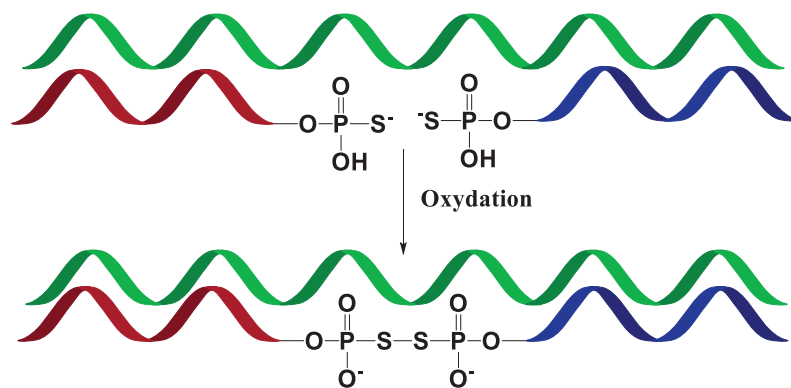


Schéma 6 : Ligation guidée de deux ADNs par leurs fonctions phosphorothioates

Nous terminerons cette partie par un exemple particulier de ponts disulfures au niveau du lien internucléosidique, qui mérite d'être mentionné en raison de son intérêt pour la **conjugaison de molécules** sur n'importe quelle position d'un ADN ou d'un ARN. Le pont S-S est porté par un lien introduit entre deux nucléosides successifs sous la forme d'un phosphoramidite non nucléosidique.³⁷ L'équipe de R. Eritja a ainsi inséré une modification disulfanyl-*tert*-butyle en plusieurs positions lors de la synthèse des oligonucléotides par la méthode aux phosphoramidites.³⁸ L'intérêt de ce groupement réside dans sa stabilité durant les différentes étapes du cycle de synthèse automatisée. Après réduction du pont disulfure, la fonction thiol obtenue est disponible pour conjuguer différents composés (**Schéma 7**).

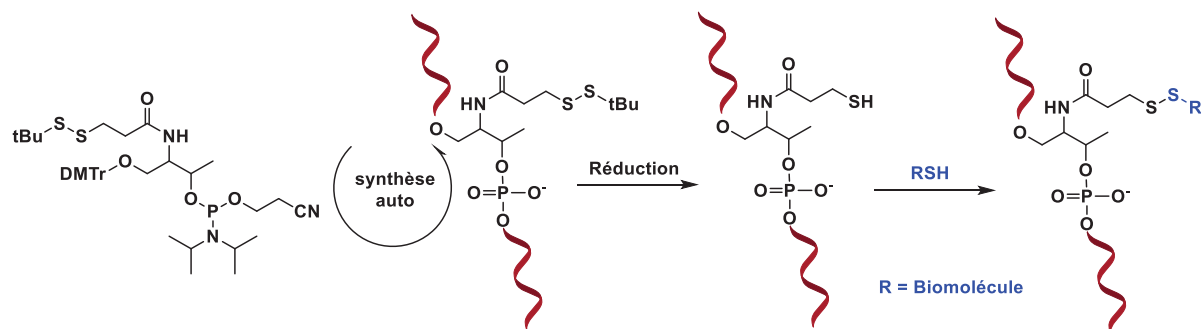


Schéma 7 : Incorporation d'un phosphoramidite non nucléosidique portant un pont disulfure et conjugaison à une biomolécule R

2.2.2. Ponts S-S au niveau des nucléobases

Les modifications sur les bases ont été particulièrement explorées. En effet, elles permettent de modifier des oligonucléotides en toutes positions et peuvent ainsi être exploitées pour de la multi-conjugaison. La présence naturelle de ponts disulfures sur les bases a été pour la première fois identifiée en 1966 par M. Lipsett.³⁹ Leur formation spontanée en condition oxydante a été constatée entre deux thiouridines natives d'un ARN d'*Escherichia Coli*. Ce résultat a mis en évidence la possibilité d'introduire chimiquement des ponts disulfures sur les bases d'oligonucléotides sans induire de fortes déstabilisations.

Une première méthode consiste à synthétiser des oligonucléotides à partir de synthons phosphoramidites comportant des ponts disulfures sur les bases. En particulier, les groupes *tert*-butyldisulfanylalkyles, qui présentent une stabilité suffisante pour éviter la dégradation lors des cycles d'incorporation durant la synthèse automatisée, ont été employés.

L'équipe de G. Glick a travaillé sur des pyrimidines modifiées par des groupements *tert*-butyldisulfanyléthyles introduits sur l'azote N³ de l'uracile et de la thymine.⁴⁰ L'hybridation permet de mettre à proximité les modifications portées respectivement par les deux brins. La coupure des ponts disulfures a généré des fonctions thiols, avant que le **pont disulfure interbrin** ne soit formé en milieu oxydant (**Figure 9A**). Des oligonucléotides auto-complémentaires portant une modification à chaque extrémité ont également été synthétisés. Après appariement dû à l'auto-complémentarité, un **pont disulfure interbrin** est formé à chaque extrémité du duplex, induisant une très forte stabilisation thermique ($\Delta T_m > 35$ °C) (**Figure 9B**).⁴¹ Cette réaction a par ailleurs été mise en œuvre avec succès sur des duplex d'oligonucléotides formés de brins non auto-complémentaires.⁴²

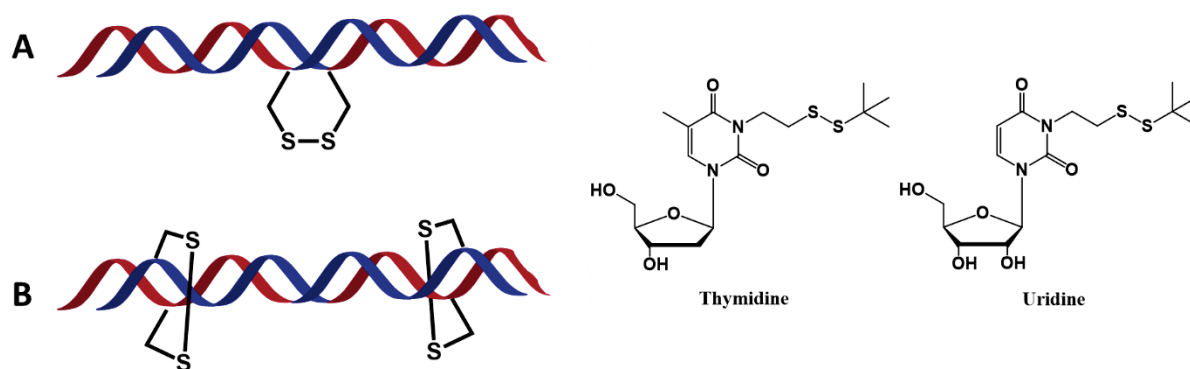


Figure 9 : Introduction d'un (A) ou deux (B) ponts disulfures interbrins dans un ADN auto-complémentaire et structure des nucléotides modifiés de l'uridine et de la thymidine

De même, la **position C⁵ de l'uracile** présente un intérêt. L'équipe de J. Piccirilli l'a utilisée pour des C-alkylations, permettant l'insertion de liens *tert*-butyldisulfanylalkyles de longueurs variables (**Figure 10**).⁴³ Des stratégies de C et N-alkylations ont en outre été employées, respectivement sur le carbone C⁸ et l'azote N² de la guanine, pour insérer des groupements *tert*-butyldisulfanylpropyles (**Figure 10**).⁴⁴ L'objectif de ces différentes modifications est de faciliter la conjugaison sur des oligonucléotides de peptides, de protéines ou d'autres oligonucléotides par exemple.

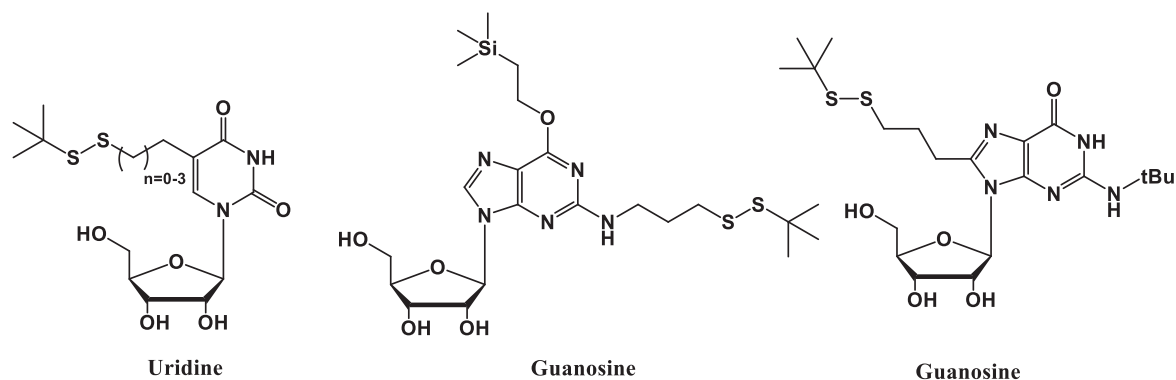


Figure 10 : Exemples de nucléosides modifiés par des groupements *tert*-butyldisulfanylalkyles

Le groupe de G. Verdine a utilisé une approche de nucléoside convertible pour une formation post-synthétique du pont disulfure sur l'adénosine.⁴⁵ Un ADN contenant une O⁶-phenyl-2'-désoxyinosine a été traité en solution par différents réactifs bis(alkylamine)disulfures pour former un lien disulfure en position N⁶ (**Schéma 8**). Cette approche a par la suite été étendue à des guanosines et des cytidines.^{45f, 46}

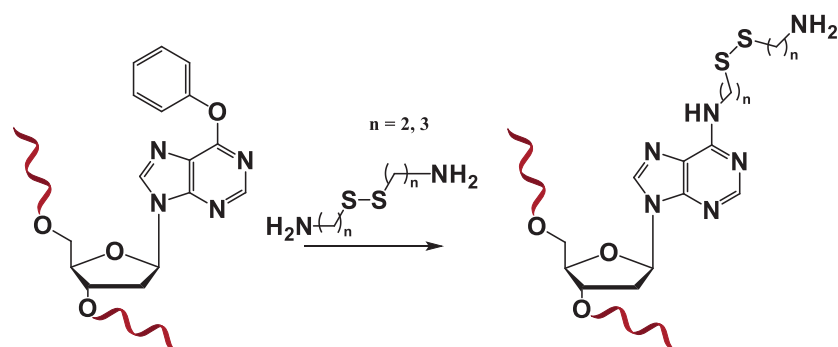


Schéma 8 : Stratégie des nucléosides convertibles

Une double hélice d'ADNs auto-complémentaires comportant des adénosines modifiées par un lien aminoalkyldisulfanylalkyle a été préparée. La réduction des ponts disulfures libère deux thiols, pouvant ensuite **lier de façon covalente les deux brins** *via* un pont disulfure (**Schéma 9**).^{45a, 47} Ces « **cross-links** » ont ainsi été mis en évidence dans des duplex d'ADNs compris entre 10 et 18 nucléosides.⁴⁸

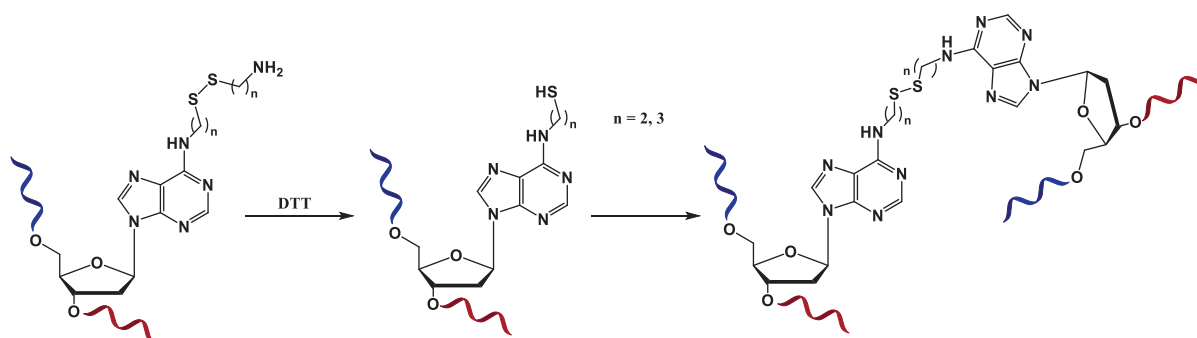


Schéma 9 : Couplage interbrin d'ADNs auto-complémentaires par des ponts disulfures en position 6 de l'adénosine

De plus, plusieurs exemples utilisent les ponts disulfures sur les bases pour coupler des molécules non-nucléosidiques. La technique est en particulier efficace pour la **conjugaison à des protéines (Schéma 10)**.⁴⁹ Un pont disulfure présent sur une base modifiée est attaqué par une fonction thiol libre d'une cystéine de la protéine ciblée.⁵⁰ La première protéine ainsi fixée est une (méthylguanine)-DNA méthyltransférase (MGMTase), dont la structure a été déterminée grâce au conjugué obtenu.⁵¹ La structure du complexe de transcription inverse du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a elle aussi été obtenue de cette manière, par conjugaison à de courts ADNs viraux.⁵²

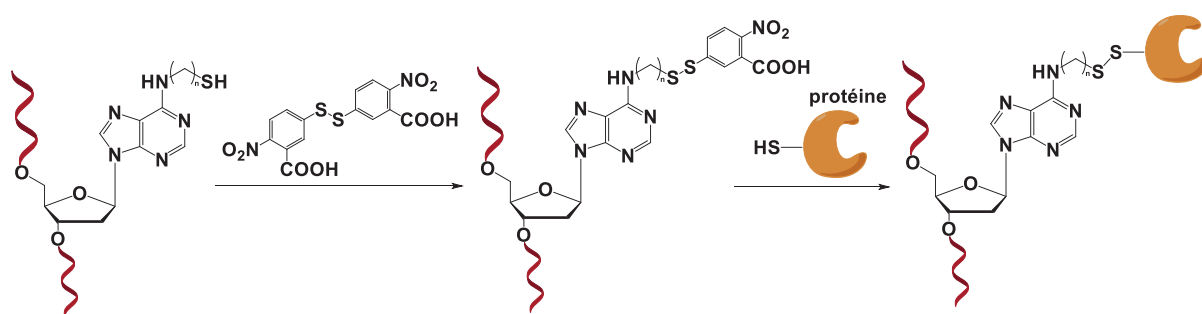


Schéma 10 : Fixation d'un ADN à une protéine par un pont disulfure entre la position N^6 d'une adénosine et un résidu cystéine de la protéine

Une autre méthode de formation post-synthétique des ponts disulfures consiste en la réaction entre la 6-thio-2'-désoxyinosine et la 4-thio-2'-thymidine⁵³ ou la 4-thio-2'-désoxyuridine^{41b}, introduites dans deux brins d'ADNs complémentaires (**Schéma 11**). La synthèse des ADNs a été effectuée en protégeant les fonctions thiols par des groupements cyanoéthyles, enlevés ultérieurement par un traitement à la DBU sur support avant déprotection des oligonucléotides. La liaison covalente disulfure est ensuite formée spontanément en conditions oxydantes à partir des deux thiolates libérés.

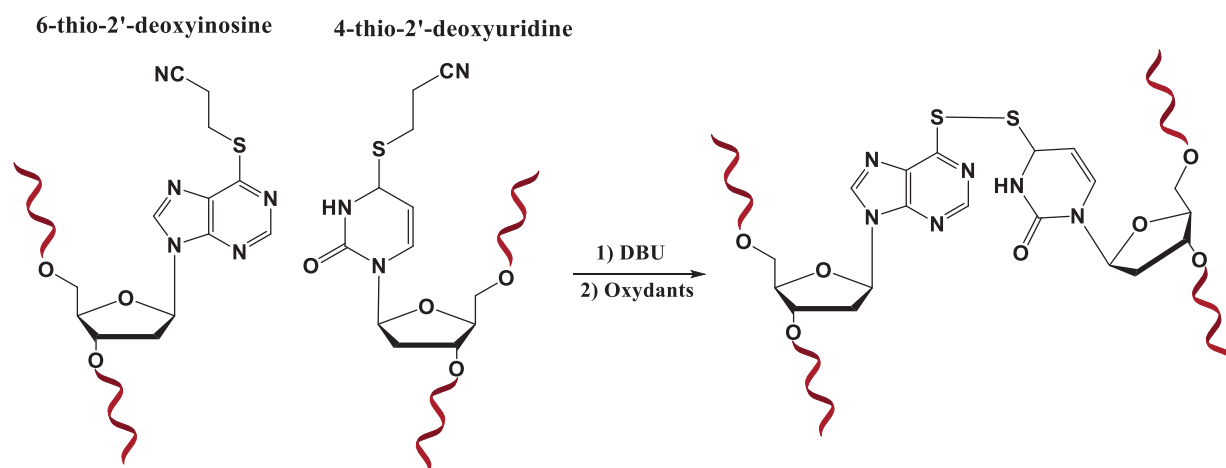


Schéma 11 : Formation d'un pont disulfure entre la 6-thio-2'-désoxyinosine et la 4-thio-2'-désoxyuridine

Enfin, des triples hélices d'ADNs, composés d'un brin s'insérant dans le grand sillon d'une double hélice d'ADN, ont été étudiées.⁵⁴ Ces structures modifiées induisent l'hybridation d'oligonucléotides avec des affinités différentes des appariements classiques selon Watson-Crick, en raison de la formation supplémentaire de liaisons hydrogènes par des appariements Hoogsteen sur les bases purines (**Schéma 12**).⁵⁵ L'introduction d'un pont disulfure entre deux thiopropynyluridines pour **lier de façon covalente les deux brins du duplex** a engendré une nette augmentation de la stabilité thermique de ces triplex ADNs (+ 35 °C à pH 7) et une affinité accrue pour le brin complémentaire introduit (**Schéma 13**).⁵⁶

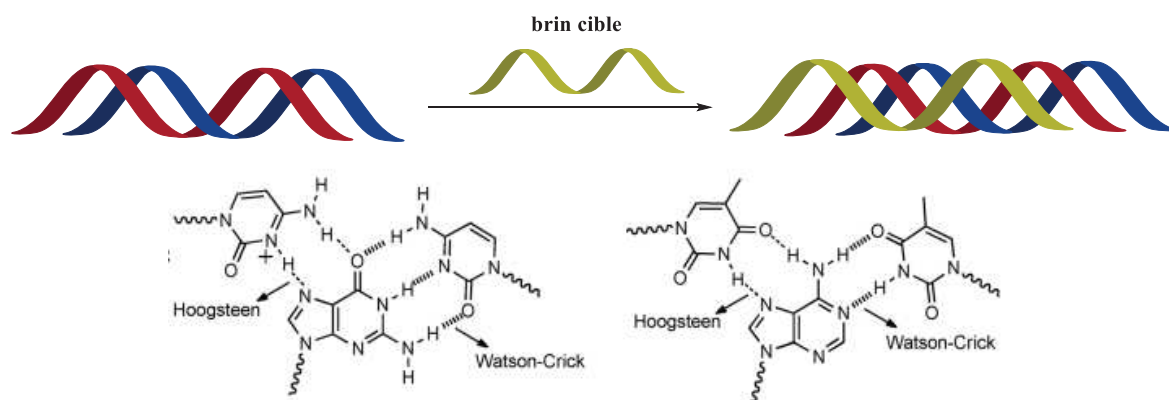


Schéma 12 : Appariements Watson-Crick et Hoogsteen dans des triplex ADN
(schéma issu de *Chembiochem* 2015 Mar 2;16(4):651-8^{54a})

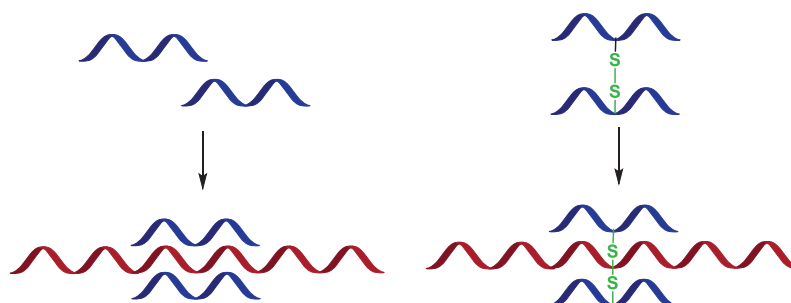


Schéma 13 : Formations de triplex en absence ou en présence d'un pont disulfure entre les deux brins complémentaires d'ADN

2.2.3. Ponts S-S aux extrémités 5' et 3'

Les hydroxyles aux extrémités des oligonucléotides sont des sites très favorables à la conjugaison en raison de leur accessibilité et leur réactivité. Une grande variété d'approches de conjugaison *via* des ponts disulfures a ainsi été mise en place sur ces positions.

2.2.3.1. *Introduction des fonctions thiols*

La première étape de la conjugaison en position 5' ou 3' consiste en l'introduction d'une fonction thiol ou d'un pont disulfure sur l'oligonucléotide. Les fonctions peuvent être directement introduites, ou insérées sous la forme de précurseurs modifiés ultérieurement.

Les méthodes employées pour les deux positions sont différentes. Pour l'extrémité 3', le pont disulfure est majoritairement issu de supports de synthèse modifiés.⁵⁷ Des supports solides contenant des ponts disulfures permettent notamment le décrochage des oligonucléotides en milieu réducteur, par exemple avec du DTT (**Figure 11**).

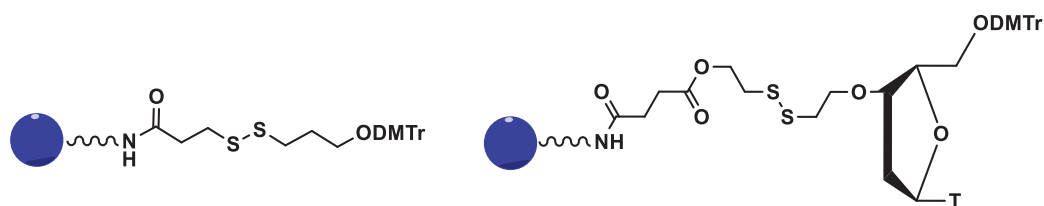


Figure 11 : Exemples de supports de synthèse pour introduire un thiol à l'extrémité 3' : support non nucléosidique (à gauche) et support avec une thymidine greffée (à droite)

La conjugaison sur la position 3' s'effectue ensuite en activant le thiol libéré lors du décrochage du support par un dérivé disulfanylpyridine, permettant la formation ultérieure d'un pont disulfure avec des composés comportant une fonction thiol (**Schéma 14**).⁵⁸

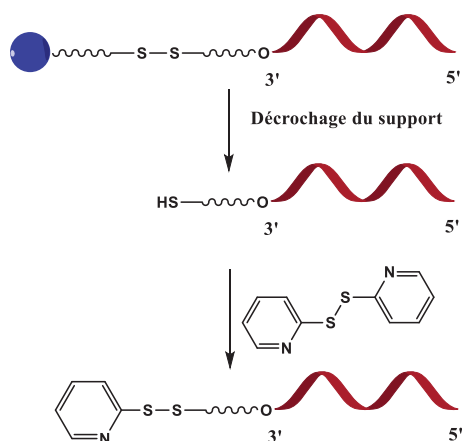


Schéma 14 : Introduction d'un thiol activé à l'extrémité 3' d'un oligonucléotide

Le thiol en position 5' est facilement introduit par différentes méthodes rapportées dans la littérature (**Schéma 15**) :

- Une fonction amide peut être formée par réaction entre un oligonucléotide modifié à l'extrémité 5' par un lien contenant une fonction amine et un ester *N*-hydroxysuccinimide (NHS) activé, fonctionnalisé par un groupement disulfanylpyridine.⁵⁹ La conjugaison est ensuite effectuée par attaque du thiol d'un composé sur ce pont disulfure activé. Des « cross-linkers » à motifs disulfures (Sulfo-LC-SPDP, LC-SPDP, Sulfo-SPDP, SPDP), développés par la société Pierce (groupe ThermoFisher Scientific), sont ainsi couramment utilisés en bioconjugaison.⁶⁰
- Une deuxième stratégie consiste en l'introduction de cystamine sur l'oligonucléotide, par attaque nucléophile d'une amine sur un carbonyle activé, par exemple sous forme d'un carbonylimidazole. Après coupure du pont disulfure en conditions réductrices, par exemple avec du DTT, le thiol libéré est activé sous forme disulfanylpyridine pour effectuer des réactions de conjugaison.⁶¹

- L'extrémité 5' d'un oligonucléotide peut également être modifiée par un thiol protégé par un groupement trityle.⁶² Ce dernier est déprotégé en présence de nitrate d'argent, permettant au thiol libéré de réagir avec un dérivé thiopyridine préparé préalablement.
- Un groupement acétate permet enfin de protéger un thiol durant l'élongation de l'oligonucléotide. Puis, en présence d'amines nucléophiles, le thiol est déprotégé, réagissant alors avec de la 2,2'-dithiodipyridine. La liaison disulfanylpyridine activée ainsi formée sert ensuite dans des réactions d'échange thiol-disulfure avec des dérivés comportant des fonctions thiols.⁶³ Cette dernière stratégie sera développée dans la suite de ce manuscrit pour introduire des ponts disulfures sur la position 2'OH d'ARNs.

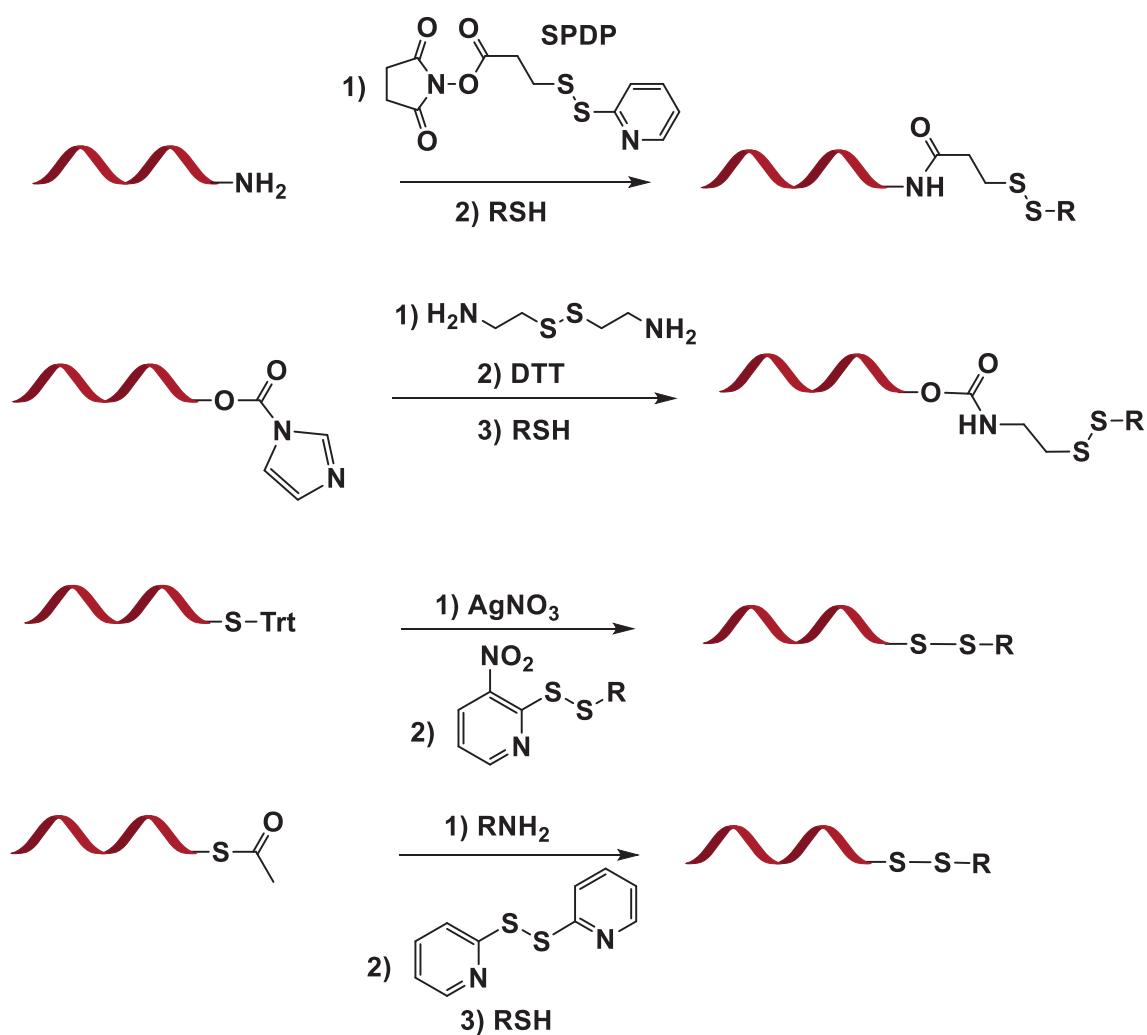


Schéma 15 : Stratégies d'introduction d'un thiol activé à l'extrémité 5'

2.2.3.2. Applications des ponts disulfures liés aux extrémités 5' et 3'

2.2.3.2.1. Conjugaison à des peptides et protéines

Tout d'abord, à l'extrémité 5', l'accessibilité du thiol permet des conjugaisons efficaces avec les cystéines libres de peptides, tels le peptide Tat^{61, 64} ou la pénétratine⁶⁵, connus pour favoriser la pénétration cellulaire⁶⁶, ou la bradykinine, une hormone peptidique agissant sur les muscles.⁶⁷ Des protéines ont également été introduites sur des ADNs, telles qu'une peroxidase et une immunoglobuline par exemple.⁶⁷ De la même manière, l'équipe de M. Yarmush a fixé une asialoglycoprotéine, une protéine liée de façon covalente à des oligosaccharides, et en particulier à des galactoses ciblant les hépatocytes.⁶⁸ Cette méthode n'est ainsi pas limitée à l'utilisation de peptides de quelques dizaines d'acides aminés.

L'extrémité 3', malgré une gêne stérique plus importante qu'à l'extrémité 5', a aussi été utilisée pour la conjugaison de peptides, tels que la séquence de transport nucléaire de l'antigène T du virus SV40, pour effectuer du transport nucléaire^{58b, 62a} ; ou un cyclopentapeptide contenant le motif arginine – glycine – acide aspartique (peptide RGD) pour cibler les récepteurs des intégrines et favoriser l'adhésion cellulaire.⁶⁹

2.2.3.2.2. Conjugaison à des petites molécules non peptidiques

D'autres classes de composés ont également été conjugués aux extrémités 5' et 3', pour effectuer de l'adressage ou de la détection.

Par exemple, pour cibler des cellules cancéreuses, des oligonucléotides ont été conjugués à de la vitamine B9, également appelée acide folique (**Schéma 16**).⁷⁰ Cette dernière possède une forte affinité pour les récepteurs des folates, surexprimés par certaines cellules cancéreuses, telles les tumeurs des ovaires ou du cerveau.⁷¹ Ces récepteurs favorisant l'internalisation des ligands, ils représentent des cibles intéressantes pour permettre une meilleure pénétration cellulaire.⁷² Un mécanisme similaire a été utilisé avec la biotine, également introduite à l'extrémité 5' pour évaluer l'amélioration de la pénétration cellulaire d'oligonucléotides.⁷³

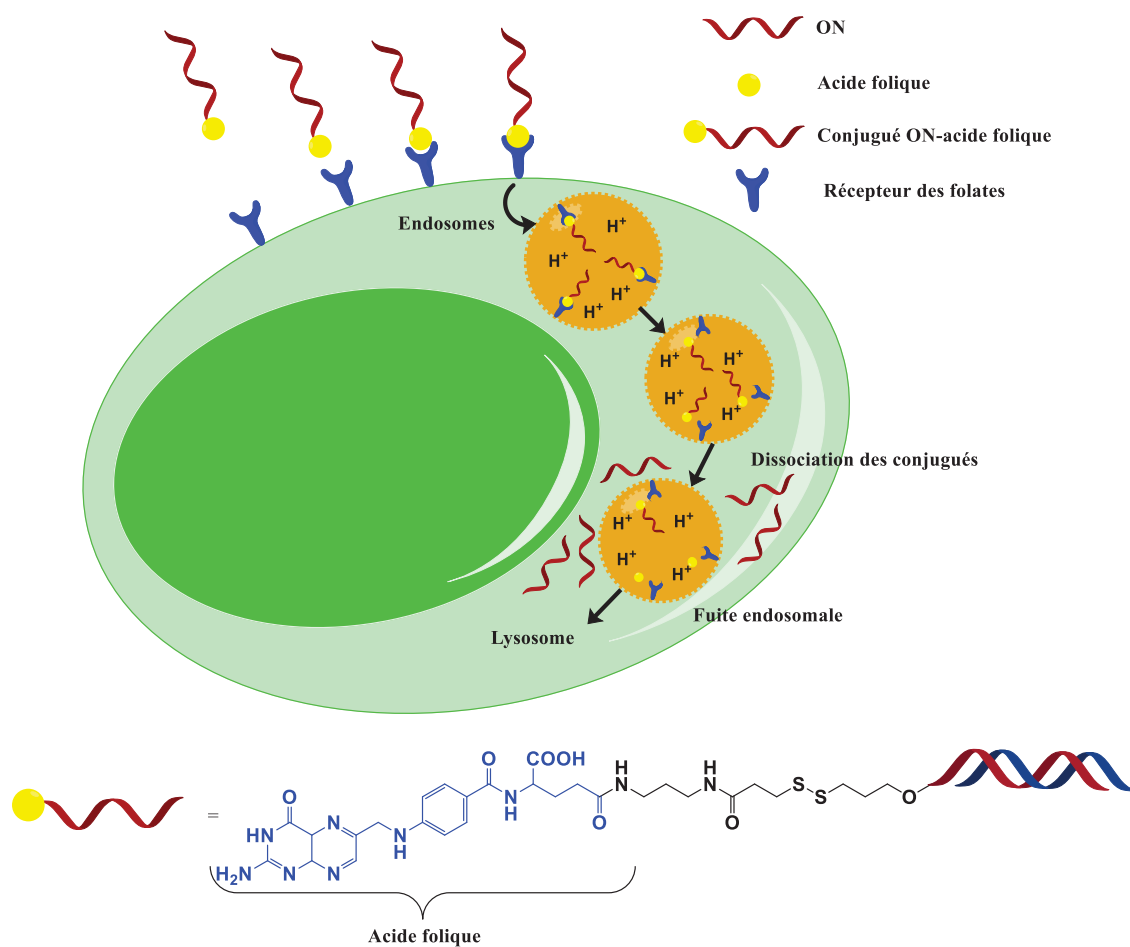


Schéma 16 : Mécanisme d'internalisation des oligonucléotides couplés à l'acide folique

2.2.3.2.3. Formation de complexes macromoléculaires

En raison des fortes contraintes stériques dues à la taille des composés, les travaux réalisés concernent essentiellement l'extrémité 5' du brin.

Des polymères comportant des fonctions thiols ont été conjugués à des oligonucléotides possédant un thiol en 5'.⁷⁴ Les propriétés du polymère (cationique, lipophile,...) par exemple, sont transmises à l'oligonucléotide, améliorant ainsi sa pénétration cellulaire par exemple. L'avantage des polymères est la répétition des monomères portant les fonctions thiols, permettant des conjugaisons multiples (**Schéma 17**). Cette multiplicité renforce l'effet biologique, en introduisant un grand nombre d'oligonucléotides dans les cellules.

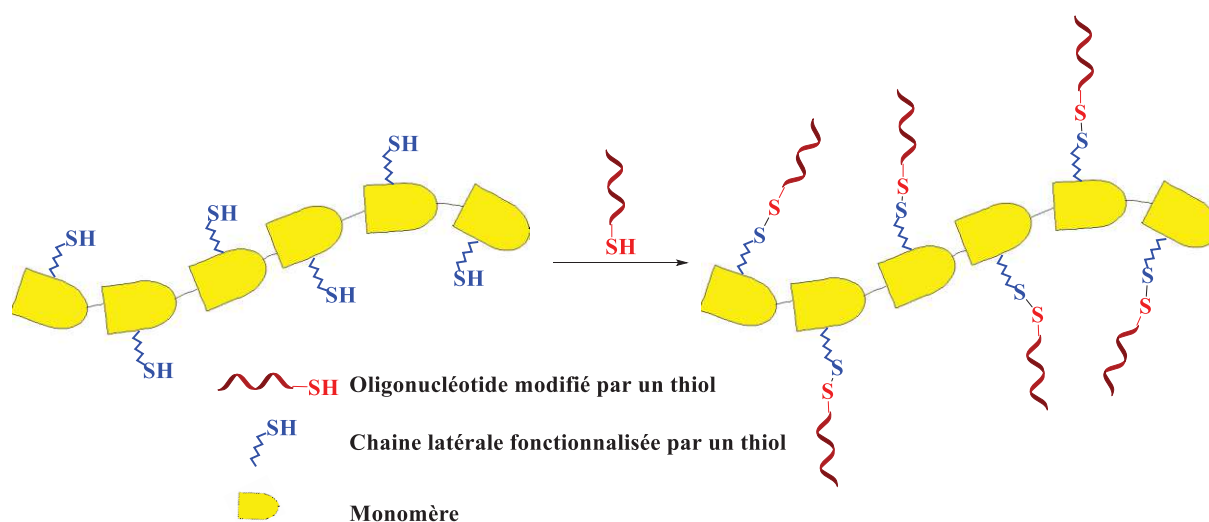


Schéma 17 : Polymère conjugué à des oligonucléotides

Une autre approche consiste à greffer un **oligonucléotide sur un thio-polyéthylène glycol**, ce polymère étant compatible avec les oligonucléotides et ne perturbant pas leur activité.⁷⁵ De plus, en utilisant des polymères cationiques, les interactions électrostatiques engendrent la formation de micelles encapsulant les oligonucléotides, facilitant ainsi leur accès au milieu intracellulaire.⁷⁶

La synthèse de **polymères de siARNs** est également rapportée, en modifiant les extrémités 5' des brins sens et antisens par un thiol. Ces fonctions libres s'associent en solution pour former un polymère d'ARN double brin (**Schéma 18A**).⁷⁷ En présence d'un polymère cationique (polyéthylèneimine PEI), les interactions électrostatiques engendrent la formation d'un complexe oligonucléotide – PEI possédant une stabilité enzymatique et une pénétration cellulaire améliorées. L'équipe d'A. Grandas a développé une approche similaire sur des ADNs auto-complémentaires. Ils ont été liés par leur extrémité 3' à un peptide, puis des structures doubles brins ont été formées en raison de l'auto-complémentarité des séquences. La **polymérisation de ces différents duplex** a ensuite été effectuée grâce à la formation de ponts disulfures entre deux résidus cystéines porté par les peptides (**Schéma 18B**).⁷⁸

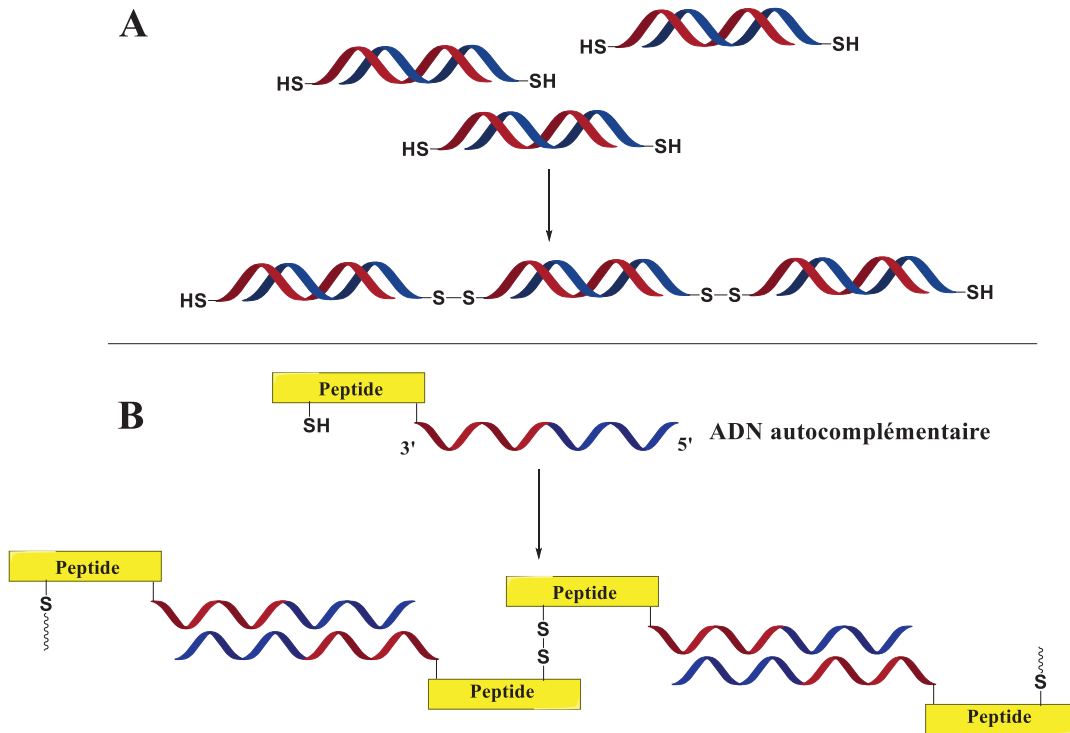


Schéma 18 : (A) Formation de polymères de duplex d'ARNs liés par les extrémités 5' (B) Formation de nanostructures ADN-peptides liés par les extrémités 3' de brins auto-complémentaires

Des **dendrimères** peuvent par ailleurs être couplés à l'extrémité 5' d'un ARN. Ils démontrent un potentiel intéressant pour la pénétration cellulaire, avec des résultats similaires à des agents de transfection.⁷⁹ Un exemple classique concerne les dendrimères comportant neuf extrémités guanidinium portées par des motifs oligoarginines⁸⁰, connues pour faciliter l'endocytose de différentes molécules.⁸¹ La conjugaison a été effectuée sur un thiol porté par une chaîne hexyle introduite à l'extrémité 5' d'un des brins du duplex (**Schéma 19**).

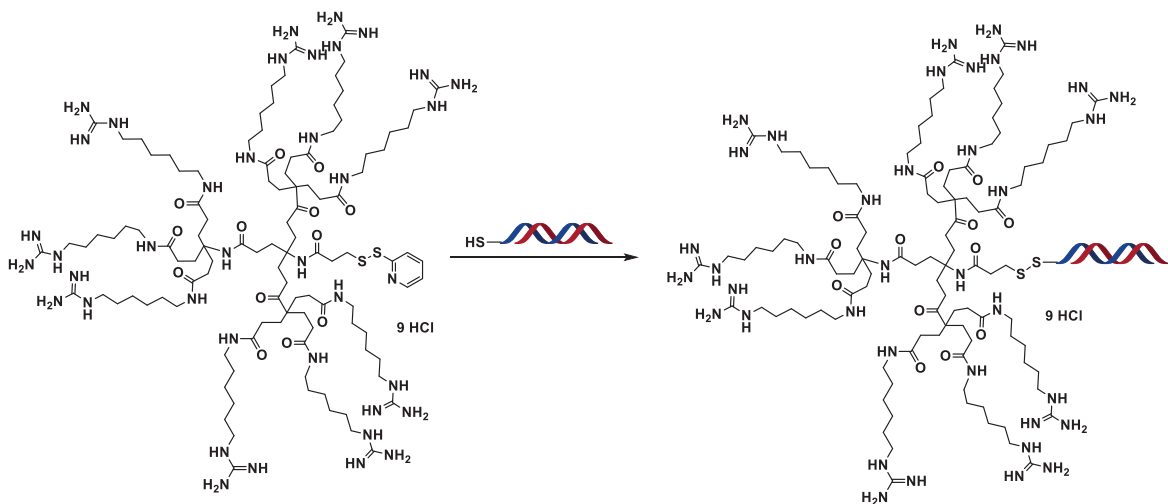


Schéma 19 : Conjugaison d'un oligonucléotide à un dendrimère

Une dernière application consiste à fixer des oligonucléotides sur des **nanoparticules**. Ces dernières peuvent être de nature lipidique ou métallique par exemple.⁸² Les différentes stratégies peuvent notamment être mises en œuvre en parallèle. Des oligonucléotides greffés à des polymères *via* des ponts disulfures ont été fixés par interaction électrostatique à des nanoparticules, permettant une meilleure stabilité en milieu biologique et une meilleure pénétration cellulaire.⁸³

2.2.4. Ponts S-S en positions 2' du ribose

Parmi les sites de modifications possibles sur un ARN, la position 2' du ribose a été la plus délaissée pour introduire des groupes ou des liens contenant un pont disulfure. En conséquence, seuls quelques exemples de cette modification en 2' et de leurs applications sont rapportés dans la littérature. Nous ne les décrirons pas ici mais nous les détaillerons dans les introductions de chaque partie pour une meilleure présentation de l'état de l'art et une justification de notre travail.

3. Objectifs de la thèse : ARNs modifiés en position 2' par des groupes ou des liens avec des ponts disulfures

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes concentrés sur l'introduction des ponts disulfures en position 2' d'ARNs pour différentes applications. La position 2' présente des avantages. Contrairement aux extrémités 5' ou 3', plusieurs modifications peuvent être introduites sur des nucléosides en des positions choisies de la séquence de l'oligonucléotide. De plus, elles peuvent être combinées avec d'autres modifications aux positions 5' et 3', en les introduisant par des réactions orthogonales. De plus, dans les ARNs 2' modifiés, le squelette phosphodiester reste intact, évitant des changements de structures ou de propriétés de l'ARN qui apparaissent lorsque les liens internucléosidiques ne sont pas naturels. Enfin, la position 2' étant orientée vers l'extérieur de la double hélice, les modifications ne perturbent pas l'appariement des bases et l'agencement régulier des nucléotides.

Dans ce paragraphe, nous présenterons succinctement le travail décrit dans les quatre chapitres de ce manuscrit au travers de trois utilisations différentes de la liaison disulfure placée en position 2' d'ARNs.

3.1. Ponts S-S dans des groupements protecteurs en position 2'

Les ponts disulfures peuvent être présents dans des groupements protecteurs de la position 2' des oligonucléotides, avec deux objectifs distincts :

- La première est l'utilisation des groupements 2'-*O*-*tert*-butyldithiométhyles comme protections des 2'OH au cours de la synthèse chimique d'ARNs par la méthode aux phosphoramidites (**Figure 12A**).^{44c, 84} En effet, l'orthogonalité de leurs conditions de déprotection en milieu réducteur par rapport à celles utilisées pour les autres groupements protecteurs usuellement présents sur des oligonucléotides est intéressante.⁸⁵
- La deuxième est l'utilisation de groupements à ponts disulfures dans une approche prodroge de siARN. Par exemple, l'équipe de H. Urata a introduit des groupements 2'-*O*-méthyldithiométhyles sur des siARNs (**Figure 12B**).⁸⁶

Une stratégie similaire a été initiée par notre laboratoire durant la thèse d'Annabelle Biscans.⁸⁷ Plusieurs uridines portant des groupements 2'-*O*-alkyldithiométhyles, avec des groupements alkyles R variés, ont été introduites dans des ARNs interférents (**Figure 12C**). Une amélioration de la stabilité enzymatique a été observée et le démasquage efficace des positions 2' a confirmé la sensibilité aux conditions réductrices de ces groupements.⁸⁸

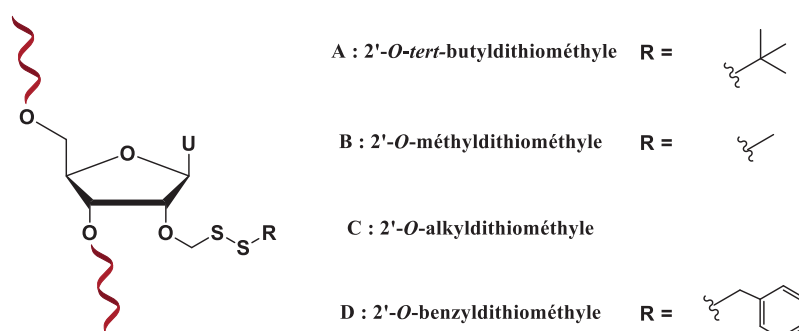


Figure 12 : Groupements contenant des ponts disulfures introduits en position 2'

Suite à ces résultats prometteurs, nous avons étudié plus particulièrement l'effet des groupements 2'-*O*-benzyldithiométhyles (2'-*O*-BnSSM) qui, grâce à leurs noyaux aromatiques, apportent de la lipophilie aux ARNs pour contrebalancer leur hydrophilie naturelle due aux phosphates (**Figure 12D**). Plusieurs groupements BnSSM ont été introduits à des positions variables des séquences. Les différents ARNs synthétisés ont permis de construire une série de siARNs modifiés dont la stabilité, le démasquage en milieu réducteur et l'activité biologique ont été évalués. Ces résultats sont exposés dans le chapitre I de ce manuscrit. La présentation des ARNs interférents et les travaux antérieurs effectués sur les prodrogues de siARNs sont également détaillés.

3.2. Conjugaison à des petites molécules d'intérêt biologique

Des petites molécules d'intérêt biologique ont été couplées sur la position 2' d'oligonucléotides *via* des ponts disulfures pour favoriser un ciblage efficace du conjugué et

que les deux partenaires soient libérés en milieu réducteur pour être fonctionnels. Deux approches distinctes ont ainsi concentré notre attention :

La première s'inscrit dans la continuité du travail sur les siARNs, dans une optique de co-thérapie. De nombreuses stratégies de co-délivrance d'oligonucléotides et de drogues anticancéreuses ont été décrites, mais aucune n'existe avec un lien covalent entre les deux partenaires. La fixation d'une molécule anticancéreuse, la doxorubicine, à un siARN *via* des liens auto-immolables contenant des ponts disulfures a donc été effectuée. Ce caractère auto-immolable permet la libération des deux composés natifs dans la cellule en milieu réducteur (**Schéma 20**). La synthèse de ces conjugués ARN-doxorubicine et l'étude de leurs propriétés sont décrites dans le chapitre II de ce manuscrit.

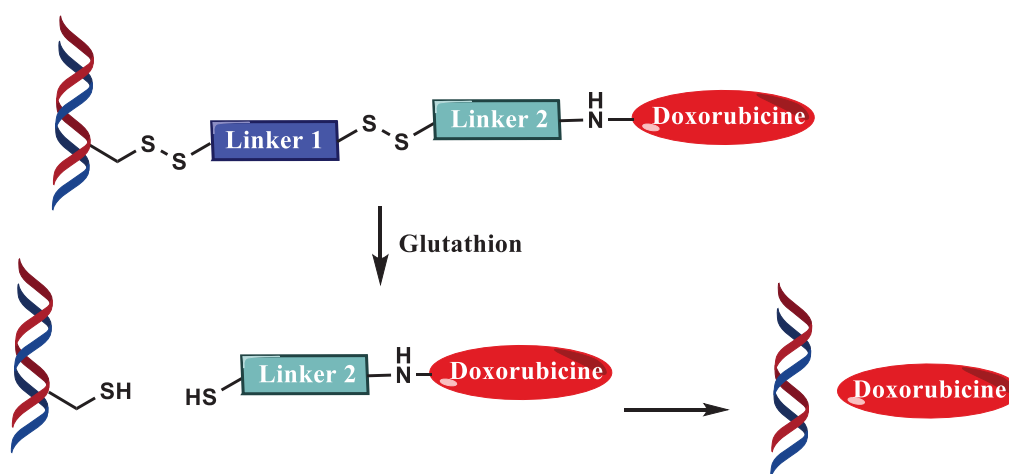


Schéma 20 : Mécanisme de démasquage du siARN et de la doxorubicine en milieu réducteur

La seconde approche a pour but de développer une méthode de conjugaison d'ARNs avec des biomolécules qui permette la fixation d'une grande diversité de molécules par une réaction d'échange thiol-disulfure. Pour ce faire, la stratégie repose sur l'introduction dans un ARN, lors de la synthèse automatisée, d'un phosphoramidite d'uridine modifiée en position 2' par une fonction carbamate portant un lien contenant un pont disulfure activé, sur lequel peut ensuite réagir un thiol porté par une biomolécule. Plusieurs ARNs ont été couplés avec différentes biomolécules, telles que des sucres, des fluorophores, des drogues ou des vitamines (**Schéma 21**). La synthèse du phosphoramidite de l'uridine 2'-O-modifiée et la stratégie de conjugaison des différents composés, ainsi que leur devenir en milieu réducteur sont développés dans le chapitre III.

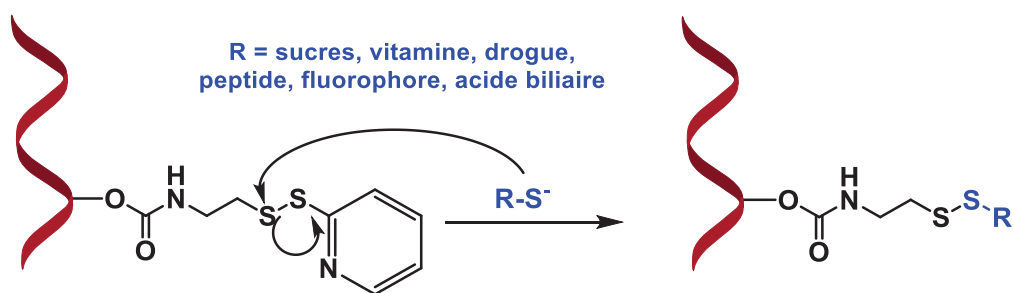


Schéma 21 : Conjugaison de biomolécules par réaction d'échange thiol-disulfure

3.3. Etude d'ARNs contraints par un lien à pont disulfure intrabrin

Comme nous l'avons présenté dans la partie 2 de cette introduction, les liens disulfures se sont révélés très utiles pour effectuer des couplages entre des oligonucléotides et étudier la structure de ces assemblages. En revanche, ces liaisons disulfures ont été très peu utilisées pour lier deux nucléotides adjacents dans un même brin d'acide nucléique, afin d'introduire des contraintes ou une rigidité dans la structure.

Dans une dernière partie de ce travail de thèse, nous avons exploité la possibilité d'introduire un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux ribonucléotides adjacents par une réaction supportée.⁸⁷

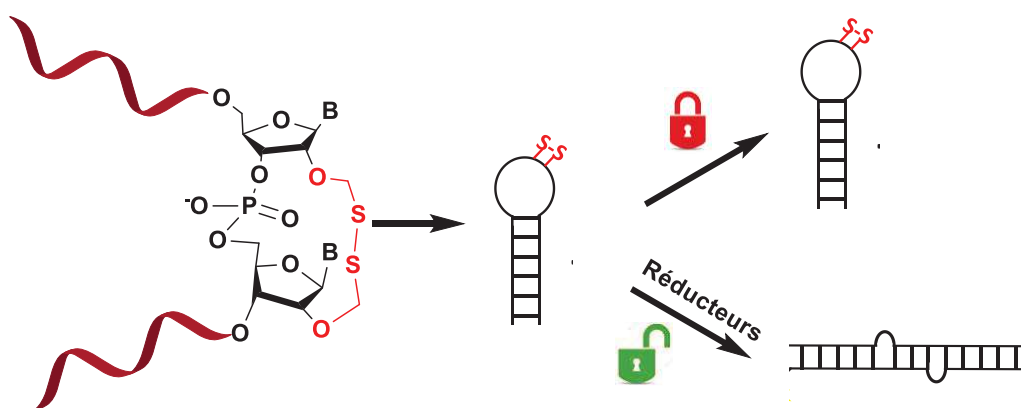


Schéma 22 : Structures modifiées par un pont disulfure intrabrin

L'effet de ce lien à pont S-S a été étudié dans un duplex d'ARN et dans des boucles de structures hairpins ARNs. En particulier, l'influence de ce pont disulfure a été étudiée sur l'équilibre hairpin - duplex d'un fragment d'ARN impliqué dans le cycle de réplication du HIV-1. Le comportement en présence d'agents réducteurs a également été évalué (**Schéma 22**). Ces différents résultats sont présentés dans le chapitre IV de ce manuscrit.

Chapitre I
Synthèse de prodrogues de siARNs modifiées par
des groupements 2'-*O*-benzyldithiométhyles
(2'-*O*-BnSSM)

Introduction

Dans ce chapitre, nous avons étudié la synthèse de prodrogues d'ARNs modifiées en position 2' du ribose par des groupements contenant des ponts disulfures. Ces modifications labiles en milieu réducteur, comme le milieu intracellulaire, ont pour but d'améliorer les propriétés des ARNs qui les portent de manière à les utiliser comme outils biologiques ou thérapeutiques.

Nous introduirons ce chapitre en rappelant le mécanisme d'ARN interférence et ses applications potentielles. Nous aborderons ensuite les difficultés rencontrées avec les ARNs interférents et l'intérêt de les modifier par une approche prodroge. Nous décrirons ensuite la synthèse des phosphoramidites modifiés permettant d'introduire des modifications contenant des ponts disulfures et la stratégie de synthèse d'oligonucléotides ainsi modifiés. Leurs propriétés biophysiques et biochimiques seront ensuite étudiées, ainsi que leur démasquage en milieu réducteur. Enfin, leur évaluation biologique sur des modèles cellulaires permettra de déterminer la pénétration cellulaire et l'inhibition engendrées par ces siARNs modifiés.

1. Le contexte biologique : l'ARN interférence

1.1. Présentation de l'ARN interférence

L'ARN interférence (ARNi) est un mécanisme biologique d'inhibition post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Ce phénomène apparaît suite à l'interaction d'un d'ARN double brin (ARNdb) avec un ARNm spécifique, engendrant sa dégradation et ainsi une diminution de sa traduction en protéines. Une première observation a été effectuée en 1990 par R. Jorgensen *et al* sur des pétunias.⁸⁹

En 1998, les groupes de C. Mello et A. Fire⁹⁰ (Prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2006) ont mis en évidence des effets de co-suppression sur *C. elegans* et ont pu définir le mécanisme de l'ARN interférence : l'introduction d'ARN double brin (ARNdb) dans les cellules provoque l'extinction spécifique de l'expression de gènes cibles.

La taille des ARNdb a également une influence. L'introduction de longs ARNdb dans des cellules de mammifères aboutit à une réaction immunitaire non spécifique et à la mort cellulaire par un phénomène appelé réponse interféron. Cette réponse immunitaire a été contournée avec succès en utilisant des ARNs courts. En effet, le groupe de T. Tuschl a montré en 2000⁹¹ que ces longs ARNs étaient coupés dans la cellule en petits fragments d'ARNdb de 21 à 23 nucléotides nommés siARNs. Ces derniers, testés sur des embryons de drosophiles⁹² et des cellules de mammifères⁹³, ont abouti dans les deux cas à l'inhibition sélective du gène ciblé. Ces découvertes ont ainsi permis d'ouvrir un grand nombre de nouvelles perspectives de recherche.⁹⁴

1.2. Mécanisme de l'ARN interférence

Les siARNs sont constitués de deux brins complémentaires constitués de 19 à 21 nucléotides appariés, phosphorylés à l'extrémité 5', et de deux ou trois nucléotides non appariés à l'extrémité 3'. Le mécanisme de l'ARN interférence se décompose en deux phases (**Schéma 23**).⁹⁵ La première, la phase d'initiation, correspond à la production des siARNs à partir d'ARNdb après coupure par l'endoribonucléase Dicer. Cette enzyme possède entre autres un domaine de liaison à l'ARNdb, un domaine hélicase séparant les deux brins et deux domaines de types RNase III permettant la coupure de l'ARN.⁹⁶

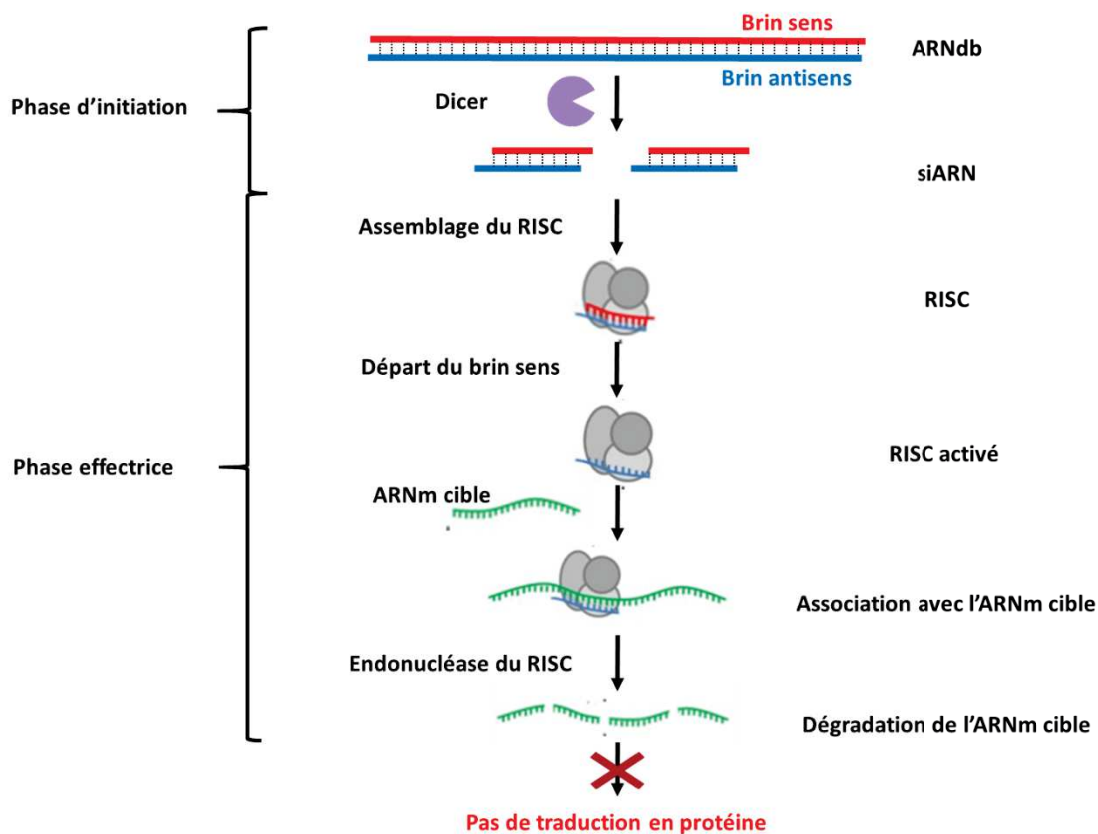


Schéma 23 : Mécanisme de l'ARN interférence

La phase suivante est la phase effectrice, dans laquelle l'interaction des siARNs avec un complexe enzymatique multi-protéique nommé RISC (RNA-Induced Silencing Complex) aboutit à la dégradation des ARNs messagers.⁹⁷ La première étape consiste en la séparation des deux brins du siARN pour ne garder que le brin antisens, complémentaire de l'ARNm ciblé. La discrimination du brin antisens est liée à la stabilité thermodynamique. D'après la littérature, le brin sélectionné est celui possédant la plus grande proportion de nucléosides A et U à l'extrémité 5', engendrant une stabilité locale plus faible.⁹⁸ Cette séparation est effectuée par une hélicase, et induit l'activation du complexe RISC.⁹⁹ Le brin antisens sélectionné par le complexe enzymatique est alors utilisé comme guide pour s'associer avec l'ARNm, par appariement des bases selon Watson-Crick.¹ Le brin antisens se complexe avec

l'ARNm au niveau de la région de rupture, dite « seed region », située entre les nucléotides 2 et 8. Cet ARNm est ensuite dégradé par une endonucléase incluse dans le complexe RISC, la protéine Argonaute 2, qui hydrolyse la liaison phosphodiester de l'ARNm au niveau des 10^{ème} et 11^{ème} nucléotides appariés à partir de l'extrémité 5' du brin antisens.¹⁰⁰ En conséquence, la traduction de cet ARNm est impossible, et la production de la protéine associée est réduite voire arrêtée.

Après dégradation de l'ARNm, le complexe RISC activé n'est pas dissocié, entraînant la réutilisation du brin antisens pour la dégradation de multiples ARNm, permettant une efficacité importante à partir de quantités très faibles de matériel injecté.¹⁰¹ Les dégradations peuvent être renforcées par l'utilisation de plusieurs siARNs différents ciblant le même ARNm, pouvant ainsi être sélectionné et dégradé par différents complexes RISC activés.

1.3. Synthèse des siARNs

Quatre principales méthodes d'obtention des siARNs peuvent être distinguées (Schéma 24) :

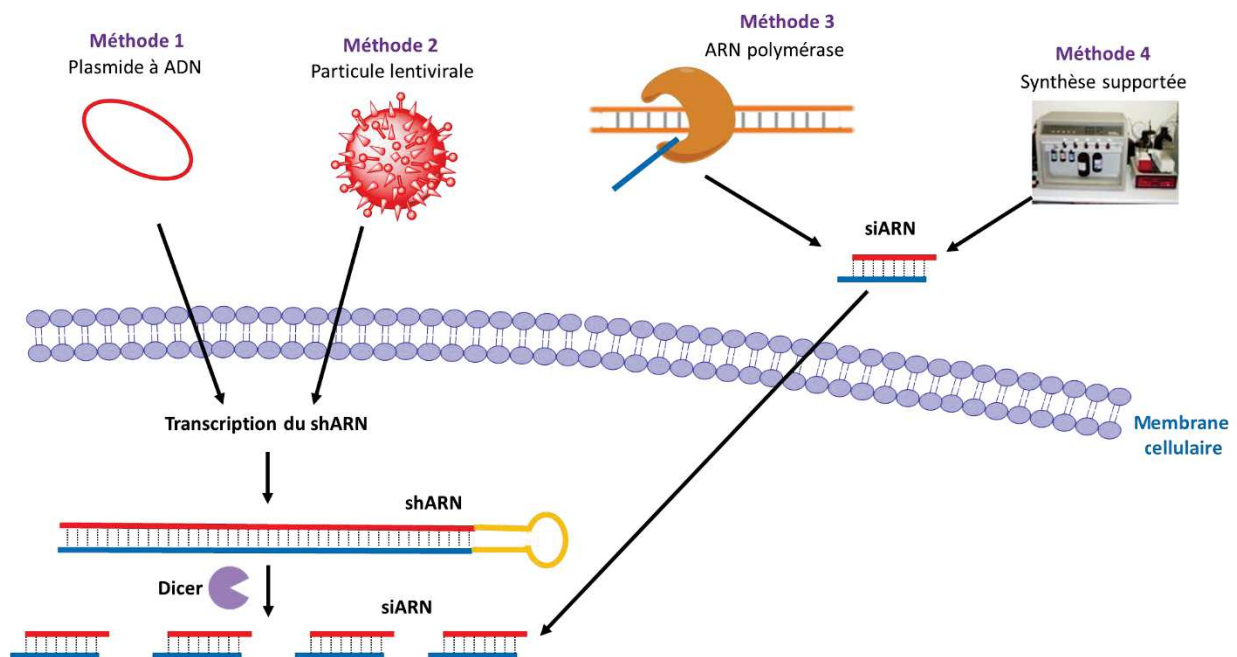


Schéma 24 : Méthodes de productions des siARNs

Méthode 1 : La machinerie cellulaire est utilisée pour produire directement les siARNs à l'intérieur des cellules. Ces dernières sont transfectées par l'intermédiaire de plasmides à ADN dont la séquence a été prédéfinie.¹⁰² Ces plasmides doivent nécessairement être composés des séquences des siARNs (21-23 nucléotides), pouvant être répétées plusieurs fois. Ils doivent également comporter une séquence promotrice d'une polymérase et une séquence terminatrice, permettant sa transcription en ARN simple brin (Schéma 25). Le design doit être élaboré pour obtenir une séquence auto-complémentaire, et récupérer une

structure « short hairpin RNA » (shARN). Cette hairpin est ensuite coupée par l'enzyme Dicer, générant les siARNs fonctionnels.

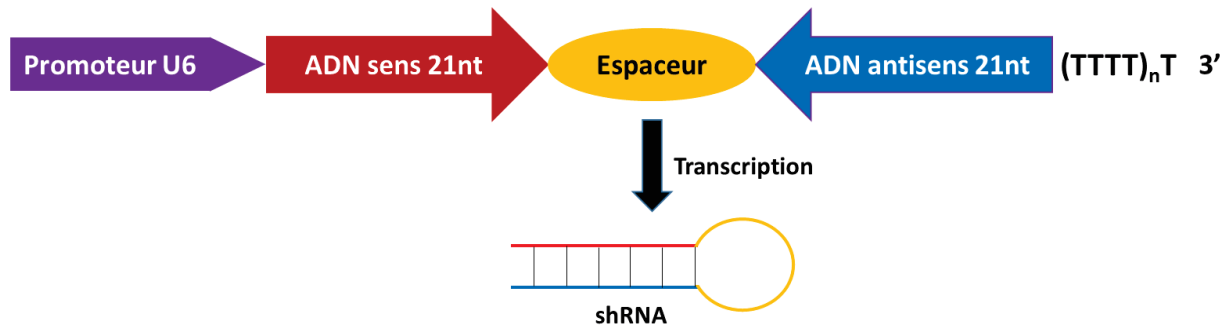


Schéma 25 : Structure des plasmides à ADN

Méthode 2 : Par rapport à la méthode précédente, des particules lentivirales sont utilisées pour introduire des siARNs dans la cellule.¹⁰³ La transfection, beaucoup moins invasive, permet une utilisation sur tout type de cellules. Une fois à l'intérieur, la production du siARN se fait selon le même mécanisme que la méthode 1. Ces deux premières méthodes permettent la production des siARNs directement au sein de la cellule.

Méthode 3 : Les siARNs sont produits *in vitro* par une ARN polymérase. Cette dernière transcrit un ADN cible pour produire les brins ARNs sens et antisens qui seront ensuite hybridés pour former le siARN. Une méthode de transfection est ensuite utilisée pour faire pénétrer ce siARN à l'intérieur des cellules.

Méthode 4 : Les siARNs peuvent enfin être efficacement préparés par synthèse chimique automatisée sur support solide. Cette méthode est particulièrement intéressante pour obtenir des oligonucléotides contenant des nucléosides modifiés. Ces derniers devront ensuite être hybridés puis introduits dans les cellules par différentes méthodes de transfection. Il s'agit de la méthode utilisée pour la synthèse des siARNs modifiés dans la suite de ce manuscrit.

1.4. Applications thérapeutiques et biologiques des siARNs

Les altérations du génome peuvent être à l'origine de la synthèse de protéines mutées ou surexprimées. Ainsi, les siARNs sont rapidement devenus des outils biologiques de choix pour dégrader de grandes quantités d'ARNm et bloquer la production des protéines associées. Il s'agit donc d'une technique puissante et rapide pour caractériser des nouvelles cibles thérapeutiques potentielles en vue du développement de médicaments. En effet, l'ARN interférence repose sur un effet spécifique puisqu'elle se base sur l'appariement des bases des ARNs. Des siARNs peuvent également cibler simultanément des protéines de structures en partie similaires, grâce aux parties communes de leurs séquences respectives. La fonction de certaines protéines a ainsi été beaucoup plus aisément déterminée.

De nombreuses études visent à utiliser l'ARN interférence pour lutter contre l'expression de gènes viraux ou anormaux. Ces dernières années ont été marquées par des investissements à la hausse de la part des industries pharmaceutiques dans ce domaine.^{13b, 104} La première utilisation des siARNs *in vivo* a été réalisée par l'équipe d'E. Song en 2003. Ils ont présenté la possibilité de réduire, chez la souris, l'expression de la protéine Fas, impliquée dans la mort des cellules du foie en cas d'insuffisance hépatique.¹⁰⁵ En effet, le foie est un organe intéressant étant donné son rôle physiologique central qui le rend plus accessible.¹⁰⁶

Plusieurs exemples de pathologies dans lesquels les siARNs présentent un potentiel intéressant ont été identifiés, et pourraient suivre l'exemple précurseur du patisiran (ONPATTRO™), le premier siARN ayant reçu une autorisation de mise sur le marché.^{13a, 107} En particulier, la persistance du siARN dans le RISC permet une action longue durée avec une fréquence d'administration plus faible. Cet effet a été notamment expérimenté sur la drépanocytose¹⁰⁸ ou le déficit en alpha 1-antitrypsine.¹⁰⁹ La recherche a également porté sur les traitements contre les virus, par exemple à la suite des dernières épidémies du virus Ebola en Afrique, aboutissant au développement de siARNs visant deux gènes du virus.¹¹⁰ Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est lui aussi une cible d'étude, dans le but de bloquer la production de protéines de capsides indispensables à la réplication du virus lors d'expériences *in vitro*.¹¹¹

Enfin, une autre approche intéressante concerne l'utilisation de l'ARN interférence dans le cadre du traitement des cancers.¹¹² De nombreuses tumeurs ont pour cause une surexpression de certaines protéines ou une division cellulaire trop importante.¹¹³ L'extinction de l'expression des gènes responsables serait donc une avancée importante dans laquelle l'ARNi semble particulièrement indiquée.

1.5. Limitation des ARNs interférents

Les siARNs possèdent différentes applications très prometteuses. Néanmoins, plusieurs limitations freinent le développement de l'utilisation des siARNs non modifiés. Tout d'abord, des problèmes peuvent apparaître, non pas liés au siARN en lui-même, mais à la réaction biologique de l'hôte. Une trop grande concentration de siARNs engendre l'activation de gènes impliqués dans leur dégradation.¹¹⁴ Les réactions immunitaires provoquées par l'introduction de composés exogènes doivent également être considérées.¹¹⁵ Elles induisent une sécrétion d'interférons, de cytokines et d'interleukines impliqués dans des processus de mort cellulaire.¹¹⁶

Ensuite, la séquence doit être spécifique et choisie avec soin pour obtenir une action ciblée, sans effets non spécifiques sur d'autres protéines.¹¹⁷ Par exemple, dans le cas de l'inhibition d'une protéine pathologique, l'oligonucléotide doit reconnaître spécifiquement l'ARNm codant pour la protéine mutée, tout en gardant une affinité faible pour l'ARNm non muté ou d'autres ARNs messagers. Cette contrainte est particulièrement importante pour l'industrie pharmaceutique. En effet, ces problèmes de non-sélectivité peuvent bloquer la

commercialisation de composés s'ils engendrent des effets secondaires trop importants lors des tests cliniques.

De plus, les siARNs non modifiés présentent des difficultés pour pénétrer dans le cytoplasme des cellules. En effet, ce sont des macromolécules hydrophiles et chargées négativement par la présence des phosphates, rendant difficile le transport à travers les membranes cellulaires hydrophobes. Ainsi, les moyens de faciliter cette pénétration cellulaire sont largement étudiés.^{13b, 118} Les ARNs non modifiés sont également très sensibles aux nucléases, présentes en grande quantité dans le milieu extracellulaire et en particulier dans le sérum. La plupart des siARNs sont donc inutilisables car dégradés avant même d'avoir atteint les cellules cibles.

Pour remédier à toutes ces limitations, développer des modifications chimiques des siARNs est nécessaire. Plusieurs stratégies ont été envisagées depuis une quinzaine d'années. La plus classique consiste à l'introduction de modifications permanentes sur la nucléobase, le sucre ou le lien internucléosidique.¹¹⁹ En rapport avec notre axe de recherche, seules les modifications introduites en position 2' du ribose seront abordées dans ce chapitre. Les groupements en position 2' permettent généralement d'augmenter les stabilités thermiques et enzymatiques des oligonucléotides, mais induisent souvent en conséquence une baisse de l'efficacité de mise en silence du gène. En effet, peu de modifications introduites sur le brin antisens, impliqué dans le mécanisme d'ARN interférence, ont eu un effet bénéfique. En particulier, l'introduction de groupements au niveau de la « seed region » se solde fréquemment par l'inefficacité du siARN.

La position 2' du ribose a été modifiée par différents groupements, dont les plus étudiés ont été présentés dans l'introduction générale, et présentent des résultats très variables. Une activité biologique a été démontrée pour des siARNs portant sur quelques positions des deux brins des modifications 2'F.¹²⁰ Un résultat similaire a été obtenu en utilisant des siARNs mixtes portant des groupements 2'-O-Me sur le brin sens et 2'F sur le brin antisens. En revanche, les modifications 2'-O-MOE ou 2'-O-Me introduites sur le brin antisens n'ont pas engendré d'activité d'interférence significative, alors qu'elles sont tolérées sur le brin sens.¹²¹ L'équipe de M. Damha a également modifié le sucre, utilisant un arabinose à la place du ribose, pour synthétiser des mimes d'ARN 2'-désoxy-2'-fluoro-β-D-arabinonucleic acid (2'F-ANA)¹²² qui ont permis l'augmentation de la stabilité enzymatique.¹²³ Il a également été prouvé que les 2'F-ANA introduits sur le brin antisens au niveau de la « seed region » permettent la conservation d'une activité biologique.¹²⁴

L'activité biologique est donc sensible à la présence des modifications permanentes, ce qui est une limitation majeure vis-à-vis de leur utilisation. De nouvelles approches pour tenter d'améliorer l'efficacité des siARNs ont donc été envisagées.¹²⁵

1.6. Approche prodrogue d'ARNs interférents

Une approche prodrogue, avec des modifications non-permanentes biolabiles en position 2', s'est ainsi avérée particulièrement intéressante. L'intérêt réside dans le masquage et la protection temporaire des siARNs pour améliorer leur stabilité enzymatique et leur pénétration cellulaire (**Schéma 26**). Une fois les siARNs délivrés dans les cellules, les modifications sont éliminées sous l'action de stimuli présents dans le milieu intracellulaire (enzymes, glutathion,...) libérant progressivement dans la cellule le siARN non modifié qui pourra exercer sa fonction.¹²⁶

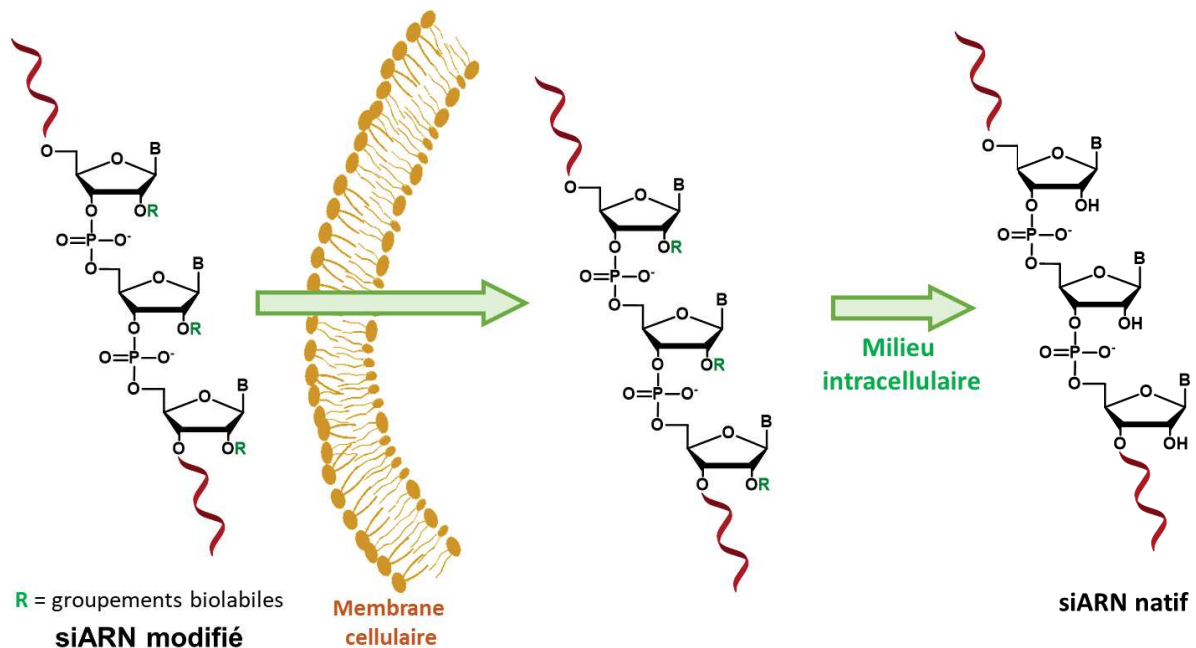


Schéma 26 : Stratégie prodrogue de siARN avec des modifications biolabiles en position 2' du ribose

2. Modification des ARNs interférents par des groupements biolabiles en position 2' du ribose

2.1. Oligonucléotides modifiés par des groupements 2'-O-acétolesters et 2'-O-thioacétolesters

Pendant une quinzaine d'années, notre équipe a travaillé sur le développement de prodrogues de siARNs portant des groupements biolabiles en position 2'. En particulier, les groupements acétolesters, dont la fonction ester peut être coupée dans les cellules par les estérases, ont été utilisés pour modifier les ARNs (**Schéma 27**).¹²⁷ La coupure de la liaison ester engendre la formation d'un hémiacétal instable, qui permet de récupérer l'ARN non modifié par départ de formaldéhyde. Un mécanisme similaire intervient dans le cas des thioacétolesters, où l'hémithioacétal intermédiaire redonne l'ARN natif par départ de thioformaldéhyde.

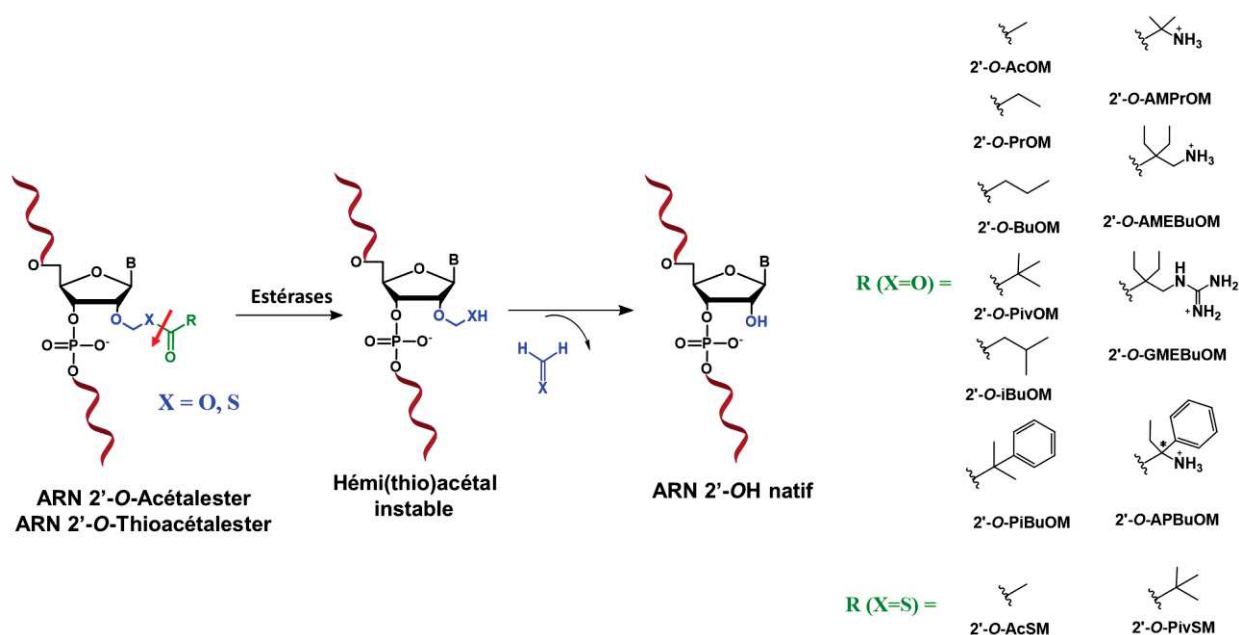


Schéma 27 : Démasquage en présence d'estérases de fonctions 2'-OH portant des modifications acétalesters et thioacétalesters

Les groupements 2'-O-acétyloxyméthyle (2'-O-AcOM), 2'-O-propionyloxyméthyle (2'-O-PrOM), 2'-O-butyryloxyméthyle (2'-O-BuOM), 2'-O-pivaloyloxyméthyle (2'-O-PivOM), 2'-O-isobutyryloxyméthyle (2'-O-iBuOM), 2'-O-acétylthiométhyle (2'-O-AcSM) et 2'-O-pivaloylthiométhyle (2'-O-PivSM) ont été tout d'abord étudiés sur des modèles d'homopolymères d'uridines. Ils ont entraîné une amélioration de la stabilité enzymatique tout en possédant un caractère enzymolabile.¹²⁷⁻¹²⁸ Parmi ces sept modifications, le groupement PivOM a présenté les meilleures propriétés et a été sélectionné pour être incorporé sur le brin sens d'un siARN, afin d'évaluer sa capacité à inhiber l'expression des gènes.

L'introduction de cinq groupements 2'-O-PivOM¹²⁹ sur l'extrémité 5' du brin sens a permis d'augmenter la stabilité enzymatique des siARNs et d'obtenir une meilleure inhibition de l'expression de la luciférase par rapport au duplex non modifié. Néanmoins, des études effectuées avec un siARN portant huit modifications 2'-O-PivOM à l'extrémité 5' n'ont montré qu'une faible amélioration de la pénétration cellulaire, et en conséquence, une augmentation limitée de l'interférence ARN détectée.¹³⁰

Une seconde approche consistait donc à utiliser des groupements portant des charges positives, par exemple les 2'-O-2-aminométhyl-2-éthylbutyryloxyméthyle (2'-O-AMEBuOM), pour compenser les charges négatives portées par les phosphates.¹³¹ Leur incorporation dans des homopolymères d'uridines n'a pas apporté l'effet escompté en raison de l'instabilité chimique de la modification.

De nouvelles études ont ensuite été effectuées sur un nouveau groupement acétalester plus lipophile que le groupe PivOM, le groupe 2'-O-phénylisobutyryloxyméthyle

(2'-O-PiBuOM), dans lequel un groupement méthyle du PivOM a été remplacé par un groupement phényle. Ces modifications, introduites sur le brin sens à l'extrémité 5', ont amélioré la pénétration cellulaire et une inhibition a été obtenue sur le sarcome d'Ewing. En revanche, elles se sont révélées trop stables pour être enlevées par les estérases. Introduites sur le brin sens, elles peuvent être envisagées comme une aide au transport du brin antisens non modifié.¹³⁰ Le projet sur les prodrogues d'ARN a été poursuivi par l'introduction de nouvelles modifications biolabiles avec des ponts disulfures en position 2' du sucre.

2.2. Oligonucléotides modifiés par des groupements 2'-O-alkyldithiométhyles

Le pont disulfure S-S constitue une autre entité biolabile suscitant un intérêt pour modifier des oligonucléotides en position 2' par des groupements alkyldithiométhyles (RSSM) (**Schéma 28**). En présence d'agents réducteurs tels que le glutathion, le pont disulfure est coupé, formant un hémithioacétal instable, qui entraîne le départ spontané de thioformaldéhyde et la libération de l'ARN natif. Ce siARN non modifié libéré joue alors son rôle d'ARN interférant.

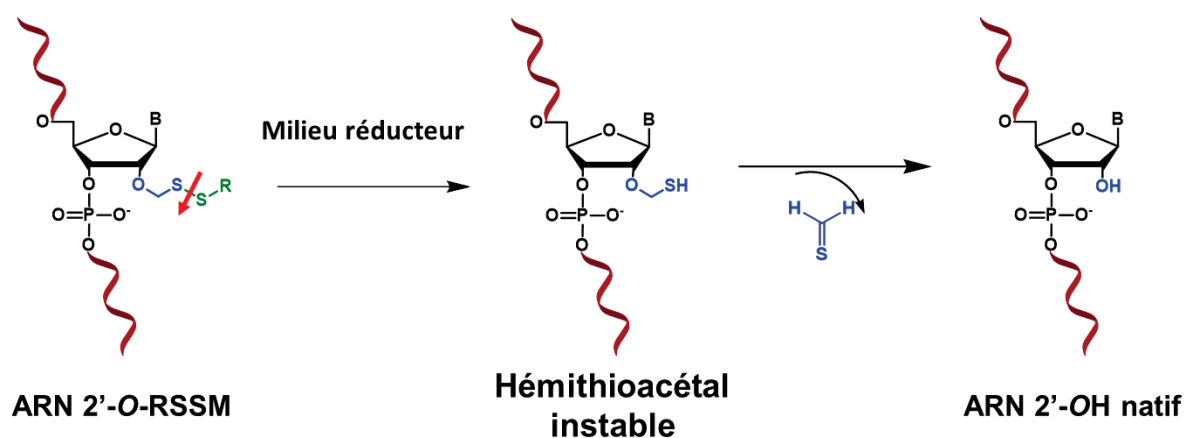


Schéma 28 : Démasquage en milieu réducteur des ARNs 2'-O-RSSM modifiés

Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction générale, l'équipe de H. Urata a été la première à démontrer le démasquage de siARNs par coupure de groupements méthylthiométhyles en position 2' (2'-O-MDTM) en présence de glutathion (10 mM). Ces modifications à ponts S-S introduites dans un siARN ont permis une inhibition de l'expression du gène de la luciférase.¹³² Récemment, une interférence notable a été démontrée avec un siARN modifié sur le brin antisens par des groupes MDTM, alors qu'un ARN correspondant modifié par des groupes 2'-O-Me n'avait aucune activité biologique.¹³³

Ces résultats confirment donc le caractère biolabile des modifications MDMT dans le milieu réducteur intracellulaire et ainsi valident leur utilisation pour une potentielle approche prodrogue.⁸⁶ Néanmoins, leur stratégie de synthèse présente deux limitations majeures. En effet, la synthèse a été effectuée après incorporation dans un ARN d'une uridine modifiée en position 2' par un groupement 2,4,6-triméthoxybenzylthiométhyle, précurseur du groupe 2'-

O-MDTM. La conversion s'effectue ensuite en présence de diméthyl(méthylthio)sulfonium tétraborate. (**Schéma 29**). Cette méthode est limitée car elle ne permet donc pas d'introduire d'autres modifications que le MDTM, avec un groupement méthyle sur le pont S-S. De plus, uniquement l'uridine 2'-O-MDTM a été préparée, limitant le nombre d'incorporations dans un oligonucléotide.

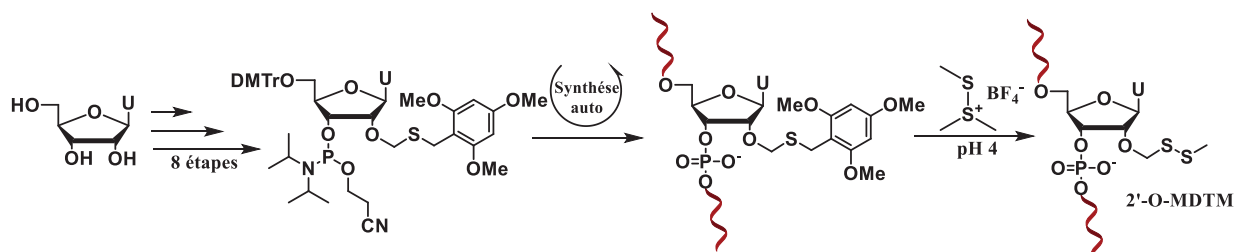


Schéma 29 : Stratégie de synthèse des ARNs 2'-O-MDTM

Dans le même objectif d'obtenir des ARNs modifiés en position 2' par des groupes contenant un pont S-S, notre équipe a mis au point une stratégie de synthèse plus flexible, par une modification post-synthétique sur support solide.⁸⁸ Des ARNs modifiés par différents groupements RSSM ont été préparés à partir de synthons uridine phosphoramidite 2'-O-AcSM, précurseurs des 2'-O-RSSM, et 2'-O-PivOM commerciaux, précurseurs des nucléosides 2'-OH (**Schéma 30**).

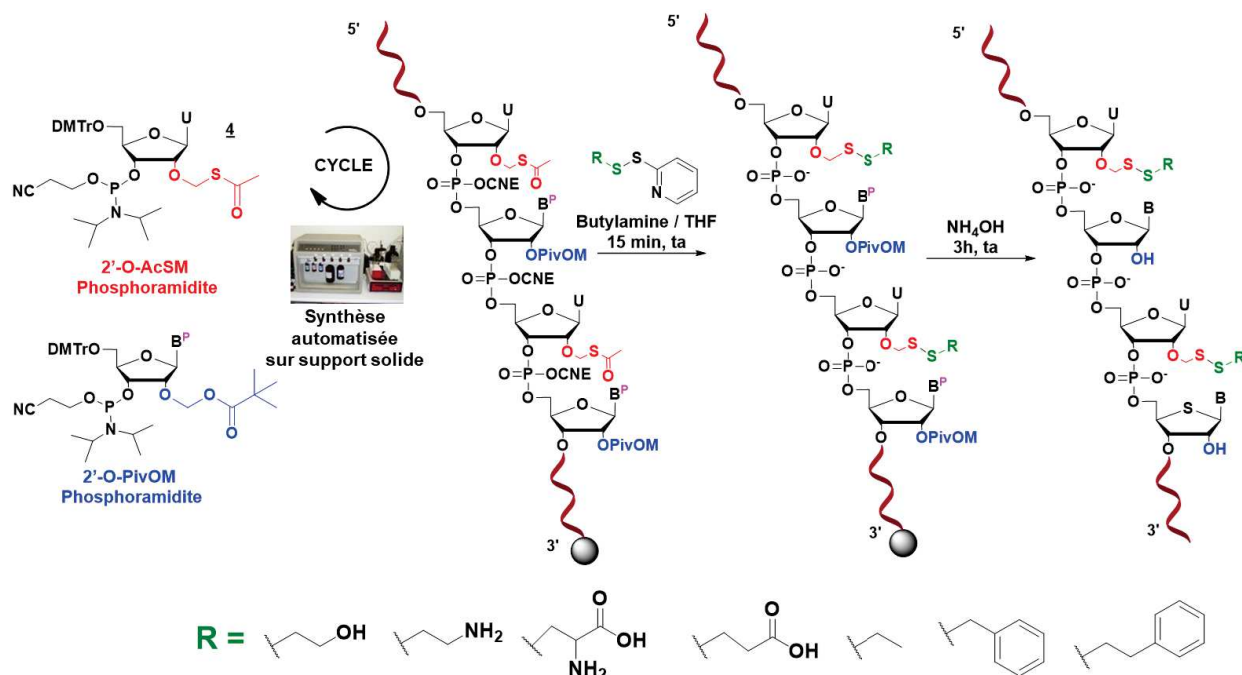


Schéma 30 : Stratégie de synthèse des ARNs mixtes 2'-O-RSSM / 2'-OH et groupements RSSM introduits sur des siARNs

Cette synthèse est basée sur une réaction d'échange thiol-disulfure entre un thiolate et un dérivé alkyldisulfanylpyridine, en présence de butylamine. L'augmentation du caractère électrophile de la liaison disulfure par la présence du motif S-pyridine favorise l'attaque du thiolate, entraînant le départ de la 2-thiopyridone comme sous-produit (**Schéma 31**). La

butylamine permet simultanément la déprotection des groupements cyanoéthyles (CNE) des phosphates. Un traitement à l'ammoniaque est ensuite utilisé pour enlever les protections basolabiles des bases A, C et G, couper le lien succinyle liant l'ARN au support solide et enlever les groupements PivOM pour uniquement conserver les modifications RSSM. Cette réaction présente l'avantage d'introduire une gamme variée de groupements R polaires ou lipophiles *via* un pont disulfure en position 2'-OH des quatre nucléotides.

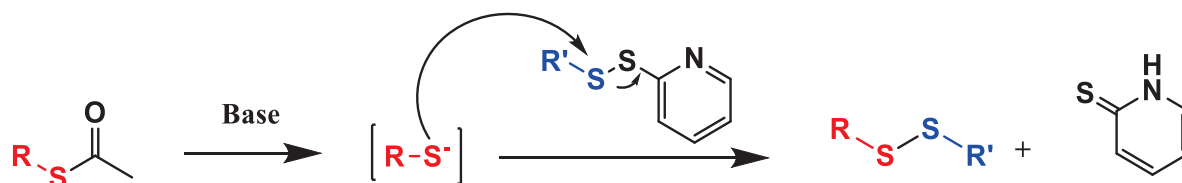


Schéma 31 : Mécanisme de la réaction d'échange thiol-disulfure

Cependant, notre méthode de synthèse présente une limitation. Lorsque deux nucléosides 2'-O-AcSM sont adjacents dans un ARN, la formation d'un pont disulfure entre les positions 2' des deux nucléosides a été remarquée. L'intérêt de ce pont disulfure entre deux nucléosides adjacents sera étudié dans le chapitre IV de ce manuscrit. La synthèse de prodrogues de siARNs mixtes 2'-O-RSSM / 2'-OH a donc été effectuée en positionnant les nucléosides modifiés séparés par au moins un nucléoside 2'-OH.

L'introduction de quatre groupements RSSM sur le brin sens d'un siARN a amélioré sa stabilité enzymatique. De plus, ces groupements ont été facilement coupés en présence d'un agent réducteur.⁸⁸ A la suite de ces premiers résultats prometteurs, nous avons choisi d'exploiter cette stratégie pour préparer et tester biologiquement des siARNs modifiés avec des groupements 2'-O-benzylthiométhyles (BnSSM). En effet, nous avons pensé que la présence de groupes benzyles lipophiles pourrait favoriser la stabilité enzymatique et la pénétration cellulaire de la même façon qu'avec la modification PiBuOM, où un groupe méthyle du PivOM avait été remplacé par un groupe phényle.¹³⁰

3. Synthèse et évaluation de siARNs mixtes 2'-O-BnSSM / 2'-OH

3.1. Stratégie de synthèse des ARNs mixtes

3.1.1. Présentation de la cible biologique

Pour évaluer l'approche prodrogue de siARN, nous avons choisi de travailler sur un siARN ciblant une protéine impliquée dans le sarcome d'Ewing. Ce cancer est une forme rare de tumeur osseuse qui touche principalement les jeunes, avec une moyenne d'âge d'incidence d'environ 13 ans. La maladie a la particularité d'être à fort potentiel métastatique, engendrant rapidement une généralisation du cancer, et des taux de survie à 5 ans variant de 60% à 20% selon l'avancée au moment de la détection. La cause de la maladie est dans la plupart des cas une translocation entre deux chromosomes non homologues, donnant lieu à la production de

la protéine de fusion EWS-Fli1.¹³⁴ Celle-ci permet l'activation des récepteurs membranaires IGF-1, impliqués dans la prolifération cellulaire, engendrant des divisions anormales à l'origine de la tumeur.¹³⁵

Cette cible biologique intéresse depuis plusieurs années le Dr. Jean-Rémi Bertrand, à l'Institut Gustave Roussy à Villejuif, avec qui nous collaborons pour tester les siARNs modifiés. Le siARN siEF-4 formé des ARNs **1** (brin sens siEF-4S) et **2** (brin antisens siEF-4AS), sur lequel nous avons travaillé, cible l'ARNm codant pour la protéine EWS-Fli1 (**Tableau 1**).

N°		Séquence 5' → 3'
1	Brin sens siEF-4S	5'GCA GCA GAA CCC UUC UUA UGA ^{3'}
2	Brin antisens siEF-4AS	5'AUA AGA AGG GUU CUG CUG CCC ^{3'}

Tableau 1 : Séquences des brins sens et antisens du siARN siEF-4 étudié

3.1.2. Synthèse du réactif benzyldisulfanylpyridine **3**

L'introduction des modifications BnSSM sur les ARNs nécessite de préparer préalablement le réactif benzyldisulfanylpyridine **3**. La réaction d'échange thiol-disulfure s'effectue à partir du phénylméthanethiol et de la 2,2'-dithiodipyridine dans le méthanol à température ambiante en 1 h 30 (**Schéma 32**).

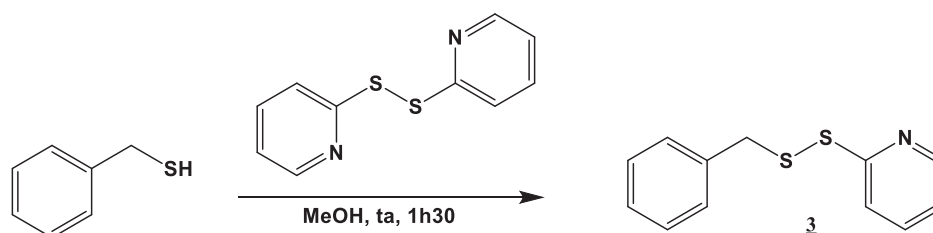


Schéma 32 : Préparation du réactif benzyldisulfanylpyridine **3**

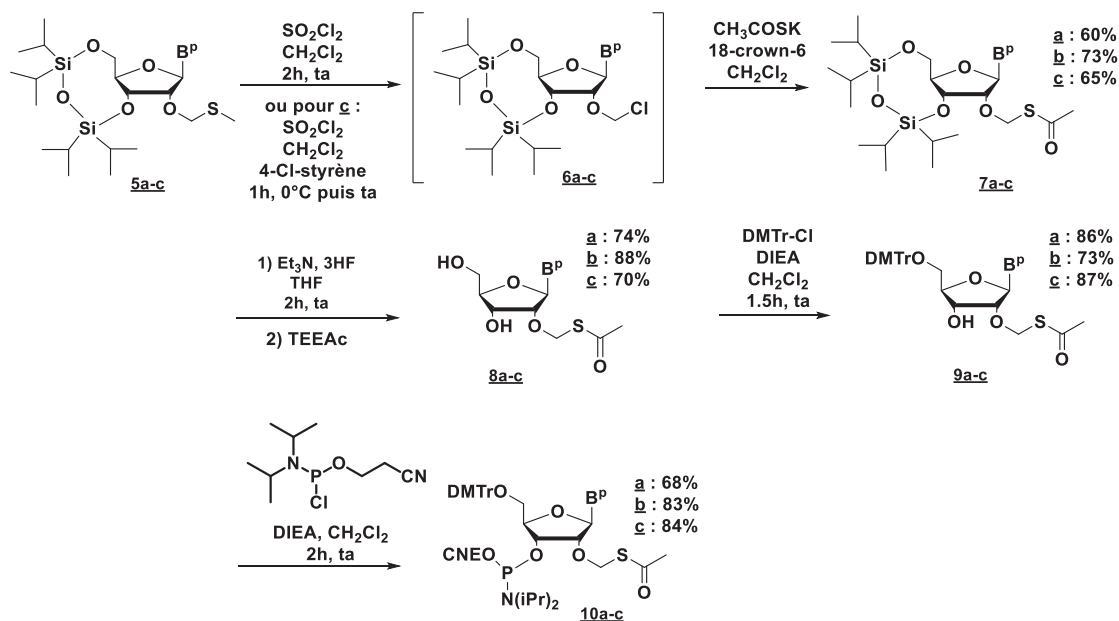
Après purification par chromatographie sur colonne, le produit **3** a été obtenu avec un rendement de 86%.

3.1.3. Préparation des synthons 2'-O-acétylthiométhyles

Pour introduire des modifications BnSSM à des positions choisies de la séquence d'ARN, les trois synthons phosphoramidites 2'-O-AcSM de l'adénosine, de la cytidine et de la guanosine ont été synthétisés par une procédure similaire à celle utilisée pour l'uridine 2'-O-AcSM **4** décrite précédemment par notre équipe.¹³⁶ Les amines présentes sur les nucléobases ont été protégées par un groupement acétyle (Ac) pour la cytidine et un groupement phénoxyacétyle (Pac) sur l'adénosine et la guanosine.

La première étape de la synthèse consiste à l'introduction du groupement thioacétyle à partir des dérivés 2'-O-méthylthiométhyles (2'-O-MTM) des nucléosides A, C et G **5a-c**

protégés en position 5' et 3' par le groupe tétraisopropyldisiloxane-1,3-diyl (TIPS), décrit par Markiewicz, à partir d'une procédure décrite par notre équipe.^{127a} Les composés 2'-O-MTM **5a-b** ont été activés par du chlorure de sulfuryle afin de former des intermédiaires 2'-O-chlorométhyléthers **6a-b** dans le DCM pour la cytidine et l'adénosine. Pour la guanosine **5c**, du 4-chlorostyrène a été ajouté pour éviter des réactions secondaires sur la base lors de la formation de l'intermédiaire **6c**. Ces intermédiaires **6a-c** n'ont pas été isolés et ont été directement mis en présence de thioacétate de potassium et d'éther 18-couronne-6 pour former les nucléosides 2'-O-AcSM-3'-5'-O-TIPS **7a-c** avec des rendements compris entre 60% et 73%. La déprotection des hydroxyles en 5' et 3' a été réalisée en milieu acide grâce au complexe triéthylamine trihydrofluorure (Et₃N, 3HF) pour donner les nucléosides 2'-O-AcSM **8a-c** avec des rendements compris entre 70% et 88%. La protection de l'hydroxyle en 5' des nucléosides 2'-O-AcSM **8a-c** a ensuite été réalisée de manière classique avec un groupement diméthoxytriyle (DMTr) en présence de diisopropyléthylamine (DIEA) dans le DCM pour former les produits 2'-O-AcSM-5'-O-DMTr **9a-c** avec des rendements de 73% à 87%. Enfin, la dernière étape de la synthèse a consisté en l'introduction de la fonction phosphoramidite en position 3'. Les composés **9a-c** ont réagi avec la 2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphine en présence de DIEA dans le DCM afin d'obtenir les phosphoramidites 2'-O-AcSM de C, A et G **10a-c** avec des rendements compris entre 68% et 84% (Schéma 33).



BP: N⁴-acetyl cytosine (a); N⁶-Pac adenine (b); N²-Pac guanine (c)

Schéma 33 : Synthèse des synthons phosphoramidites 2'-O-AcSM **10a-c**

Les phosphoramidites **10a-c** ont été obtenus en 4 étapes à partir des nucléosides 2'-O-MTM-3',5'-O-TIPS avec des rendements globaux de 26% pour la cytidine **10a**, de 39% pour l'adénosine **10b** et de 33% pour la guanosine **10c**.

3.2. Choix de la structure des différents ARNs partiellement modifiés

Nous avons modifié les brins sens **1** et antisens **2** du siARN siEF-4, qui sont composés de 21 nucléotides dont 19 complémentaires. Pour évaluer l'influence du nombre et du positionnement des modifications BnSSM, la préparation de plusieurs ARNs a été envisagée (**Tableau 2**), possédant :

- 4 modifications à l'extrémité 5' (**11** pour le brin sens et **15** pour le brin antisens)
- 3 modifications à l'extrémité 3' (**12** pour le brin sens et **16** pour le brin antisens),
- 3 modifications aux extrémités 5' et 3' (**13** pour le brin sens et **17** pour le brin antisens)
- 7 modifications réparties sur la séquence (**14** pour le brin sens et **18** pour le brin antisens)

Brin	N°	Séquences 5' → 3' ^a	Représentation schématique ^b
sens	1	5' GCA GCA GAA CCC UUC UUA UGA 3'	
	11	5' G_RCA_RGC_RA G_RAA CCC UUC UUA UGA 3'	
	12	5' GCA GCA GAA CCC UU C_RUU_RA U_RGA 3'	
	13	5' G_RCA_RGC_RA GAA CCC UU C_RUU_RA U_RGA 3'	
	14	5' G_RCA GC_RA GA_RA CC_RC UU_RC UU_RA U_RGA 3'	
antisens	2	5' AUA AGA AGG GUU CUG CUG CCC 3'	
	15	5' A_RUA_RAG_RA A_RGG GUU CUG CUG CCC 3'	
	16	5' AUA AGA AGG GUU CU G_RCU_RG C_RCC 3'	
	17	5' A_RUA_RAG_RA AGG GUU CU G_RCU_RG C_RCC 3'	
	18	5' A_RUA A_RGA A_RGG G_RUU C_RUG C_RUG C_RCC 3'	

Tableau 2 : Séquences et représentation schématique des brins siARNs 2'-O-BnSSM modifiés

^a**C_R, A_R, G_R, U_R** = 2'-O-BnSSM ribonucléotides; G, C, A, U = 2'-OH ribonucléotides

^b● = modification 2'-O-BnSSM

3.3. Synthèse des ARNs mixtes 2'-O-BnSSM / 2'-OH

Les oligonucléotides **11** à **18** ont été obtenus en deux étapes. Dans un premier temps, les ARNs ont été assemblés sur support solide sur synthétiseur automatique d'oligonucléotides à l'échelle de la micromole à partir des phosphoramidites 2'-O-PivOM et 2'-O-AcSM.

Chapitre I : Synthèse de prodrogues de siARNs modifiées par des groupements 2'-O-benzylthiométhyles

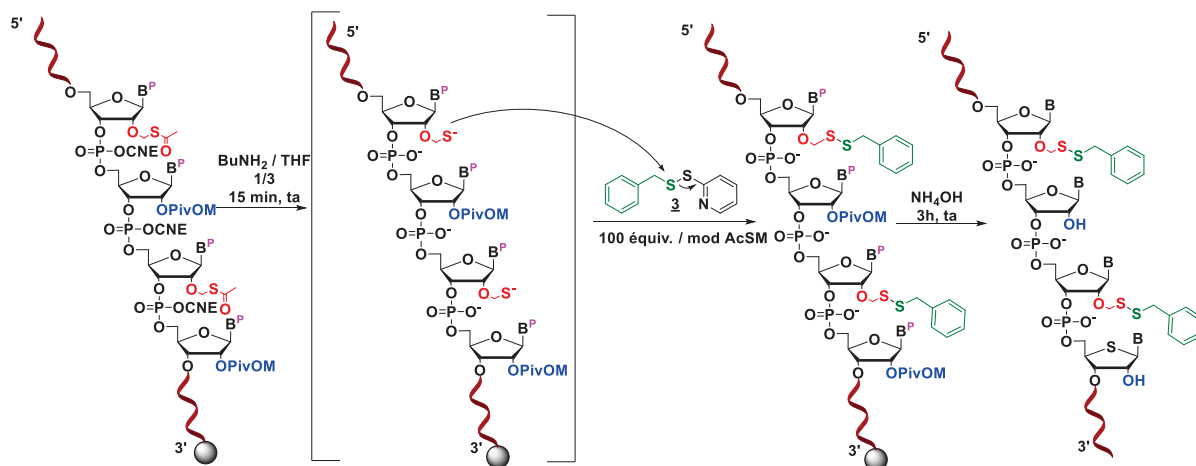


Schéma 34 : Stratégie de synthèse des ARNs mixtes 2'-O-BnSSM / 2'-OH

Les conditions standards d'élongation d'ARN ont été utilisées : 180 s de couplage, 160 s de capping, 15 s d'oxydation et 65 s de détritulation. Les rendements d'incorporation obtenus ont été supérieurs à 98% pour tous les phosphoramidites.

Dans un deuxième temps, la transformation des dérivés 2'-O-AcSM en 2'-O-BnSSM a été réalisée sur l'ARN toujours accroché au support solide par la stratégie présentée précédemment (**Schéma 34**). Les oligonucléotides ont été traités avec 100 équivalents de réactif **3** par nucléoside 2'-O-AcSM (soit 400 équiv. pour **11** et **15**, 300 équiv. pour **12** et **16**, 600 équiv. pour **13** et **17** et 700 équiv. pour **14** et **18**) dans un mélange THF / BuNH₂ (3:1, v/v) pendant 15 min. Le large excès de réactif **3** permet de favoriser l'introduction des groupements 2'-O-BnSSM par rapport à la formation de ponts disulfures interbrins.⁸⁷ La dernière étape est une déprotection avec une solution d'ammoniaque pendant 3 h.

Les oligonucléotides bruts ont été analysés puis purifiés par HPLC échangeuse d'ions (IEX-HPLC) et caractérisés par spectroscopie de masse MALDI-TOF. Sur les chromatogrammes HPLC, les ARNs 2'-O-BnSSM / 2'-OH obtenus représentent des proportions variant de 35% à 55% dans les bruts de déprotection, indiquant que la méthode est efficace pour obtenir les différents ARNs modifiés (**Tableau 3**).

Chapitre I : Synthèse de prodrogues de siARNs modifiées par des groupements 2'-O-benzylthiométhyles

Brin	ARN	m/z calculée	m/z obtenue ^a	ARN d'intérêt ^b (%)	Quantités isolées ^c (nmol)
Sens	<u>11</u>	7329,1	7328,7	35	35,5
	<u>12</u>	7160,8	7159,9	55	40,6
	<u>13</u>	7665,7	7664,2	50	27,9
	<u>14</u>	7834,0	7832,9	35	34,3
Antisens	<u>15</u>	7385,2	7384,1	42	31,3
	<u>16</u>	7216,9	7215,7	50	57,5
	<u>17</u>	7721,7	7719,6	42	36,1
	<u>18</u>	7890,0	7889,5	37	32,1

Tableau 3 : ARNs 11 à 18 modifiés par les groupements 2'-O-BnSSM

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ([M-H])

^bPourcentage du pic de l'ARN d'intérêt en aire relative du chromatogramme IEX- HPLC du brut de déprotection à 260 nm

^cQuantités isolées après purification mesurées par spectrophotométrie à 260 nm à partir d'une synthèse à l'échelle de 1 µmol

Une corrélation entre le nombre de modifications BnSSM et les quantités d'oligonucléotides isolées peut être identifiée. En effet, les meilleurs résultats sont obtenus pour les ARNs 12 (55% dans le brut, 40,6 nmol isolées) et 16 (50% dans le brut, 57,5 nmol isolées) portant trois modifications à l'extrémité 3', et de moins bons résultats pour les ARNs 13 (50% dans le brut, 27,9 nmol isolées), 14 (35% dans le brut, 34,3 nmol isolées), et 18 (37% dans le brut, 32,1 nmol isolées) portant six ou sept groupements BnSSM.

Ce résultat s'explique par la formation incomplète du pont disulfure entre les thiolates et le dérivé benzyldisulfanylpyridine, entraînant la formation de sous-produits avec un ou plusieurs groupes BnSSM en moins. Sur la **Figure 13**, le chromatogramme HPLC et le spectre de masse MALDI-TOF montrent l'oligonucléotide 16 attendu, comportant trois modifications, présent à 50% et seulement 8% d'ARN avec un groupe BnSSM non incorporé. A l'inverse, pour l'ARN 14, contenant sept modifications (**Figure 14**), la proportion de l'oligonucléotide attendu est plus faible (35%), alors qu'une proportion plus importante de sous-produits comportant une (11%) ou deux (7%) modifications non incorporées est détectée.

Après purification, les ARNs sont obtenus avec une grande pureté (**Tableau 3**). Les différentes synthèses montrent ainsi l'efficacité de la méthode d'introduction de modifications 2'-O-BnSSM alternées sur les siARNs.

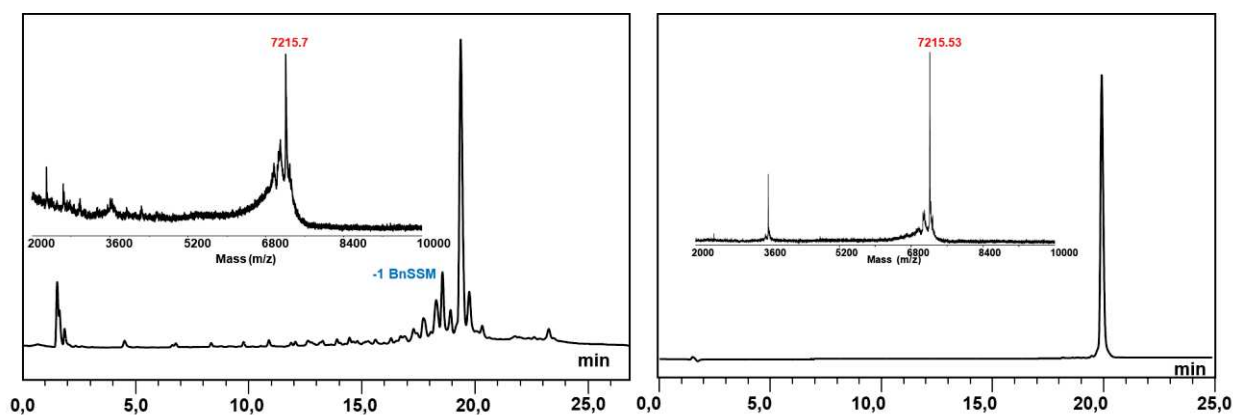


Figure 13 : Chromatogramme IEX-HPLC et spectre MALDI-TOF du brut de déprotection (à gauche) et du produit purifié (à droite) de l'ARN **16** contenant trois modifications BnSSM

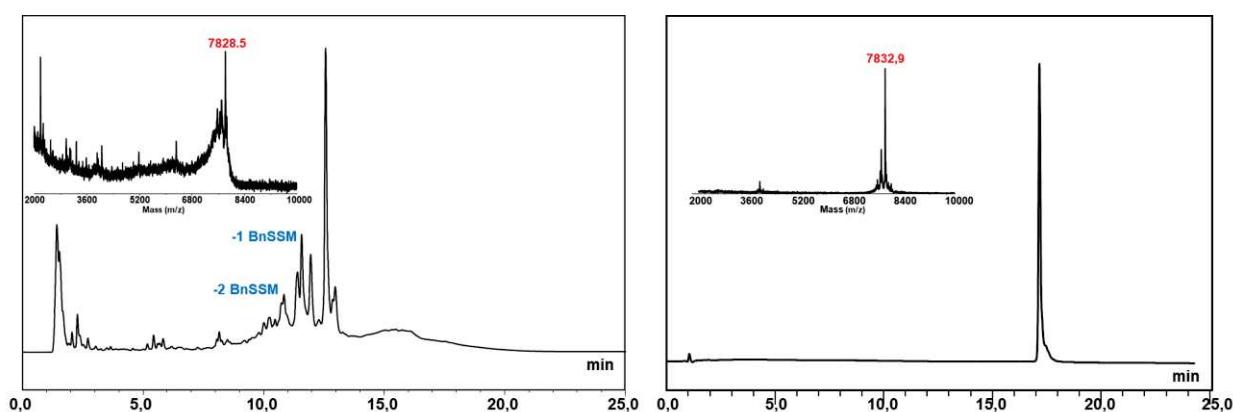


Figure 14 : Chromatogramme IEX-HPLC et spectre MALDI-TOF du brut de déprotection (à gauche) et du produit purifié (à droite) de l'ARN **14** contenant sept modifications BnSSM

3.4. Evaluation des siARNs 2'-O-BnSSM modifiés

En combinant les cinq brins sens, non modifié **1** et modifiés **11** – **14**, et les cinq brins antisens, non modifié **2** et modifiés **15** – **18**, 21 siARNs ont été formés et ont ensuite été évalués. Ils seront désignés sous la forme **brin sens** (**1**, **11**, **12**, **13** ou **14**) / **brin antisens** (**2**, **15**, **16**, **17** ou **18**). Les différents tableaux de ce chapitre seront présentés de haut en bas avec : les duplex formés avec le brin antisens non modifié **2** (**sens** / **2**) puis, formés avec le brin sens non modifié **1** (**1** / **antisens**), formés avec le brin antisens **15** (**sens** / **15**), avec le brin antisens **16** (**sens** / **16**), avec le brin antisens **17** (**sens** / **17**) et enfin avec le brin antisens **18** (**sens** / **18**).

3.4.1. Stabilité thermique des siARNs modifiés

L'incorporation de modifications dans un siARN peut perturber l'appariement des deux brins et ainsi entraîner une instabilité pouvant être problématique pour l'efficacité biologique. En particulier si la déstabilisation thermique du duplex est importante au point de ne plus former de duplex stables à la température physiologique de 37°C, le siARN n'existera plus sous

une forme active pouvant être reconnu par les complexes enzymatiques impliqués dans l'ARN interférence.

Pour vérifier la stabilité des siARNs modifiés, des études de dénaturation thermique ont été effectuées par spectrophotométrie UV à 260 nm. En effet, l'association ou la dissociation de la double hélice, en réponse à un gradient de température, engendre une variation de l'absorbance : l'absorbance des deux brins dissociés est supérieure à celle des deux brins appariés, en raison d'un effet hyperchrome lors de la montée en température. La mesure de ces variations aboutit à une courbe d'allure sigmoïdale (courbe de fusion ou de dénaturation de l'ARN). Son point d'inflexion correspond à la température pour laquelle un mélange équimolaire entre les formes duplex et libres des deux brins est obtenu. Cette température de fusion, notée T_m (« melting temperature »), rend compte de la stabilité thermique du duplex (**Figure 15**).

Nous avons étudié les stabilités thermiques de 21 duplex formés des brins sens **1** et **11-14** et antisens **2** et **15-18** modifiés et non modifiés. Les différentes valeurs de T_m obtenues ont été déterminées grâce au maximum de leurs courbes dérivées respectives et comparées à celle du duplex non modifié **1 / 2**. Les résultats sont calculés à partir de la moyenne des T_m de deux courbes d'hybridation et de deux courbes de fusion. Les valeurs sont rapportées dans le **Tableau 4**.

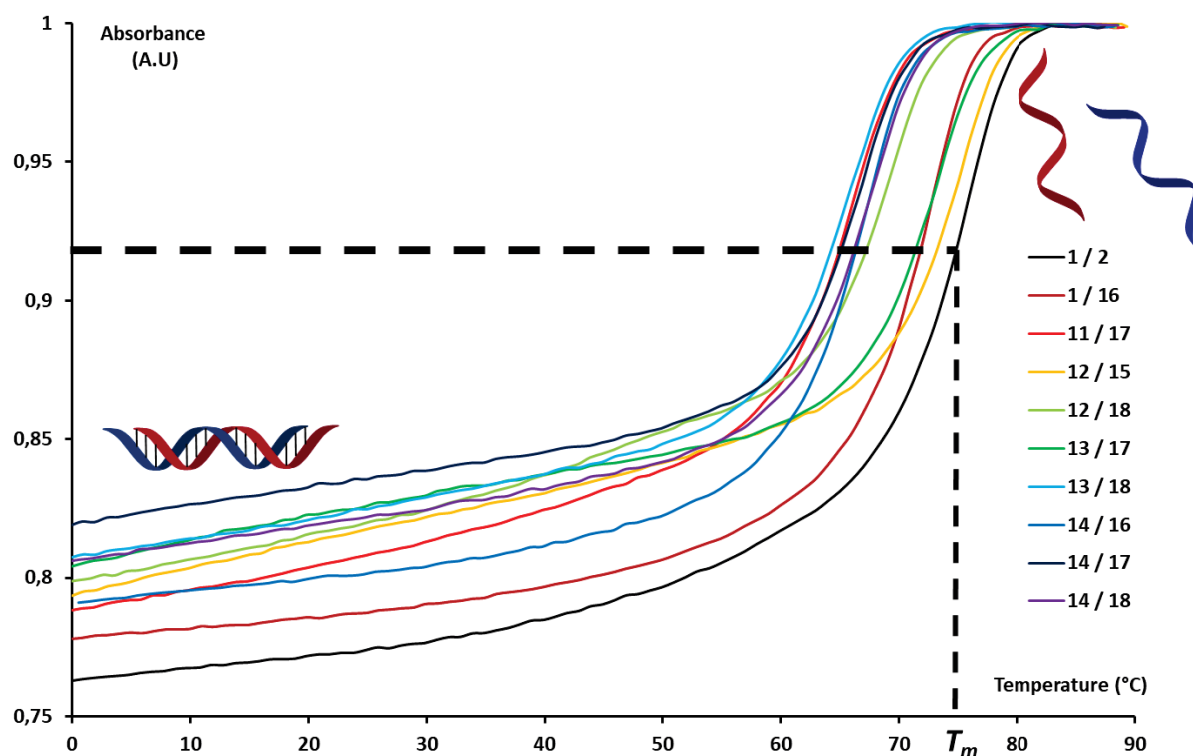


Figure 15 : Exemples de courbes de dénaturation thermique obtenues lors de l'analyse des siARNs modifiés

Chapitre I : Synthèse de prodrogues de siARNs modifiées par des groupements
2'-O-benzylthiométhyles

N°	Duplex étudié	T_m (°C) ^a	ΔT_m (°C) ^b	ΔT_m / modification (°C) ^c
siEF-4 (<u>1</u> / <u>2</u>)		75,6	-	-
<u>11</u> / <u>2</u>		67,2	-8,4	-2,1
<u>12</u> / <u>2</u>		76,5	+0,9	+0,3
<u>13</u> / <u>2</u>		70,1	-5,5	-0,9
<u>14</u> / <u>2</u>		66,9	-8,7	-1,2
<u>1</u> / <u>15</u>		70,5	-5,1	-1,4
<u>1</u> / <u>16</u>		72,1	-3,5	-1,2
<u>1</u> / <u>17</u>		70,5	-5,1	-0,9
<u>1</u> / <u>18</u>		66,0	-9,6	-1,4
<u>11</u> / <u>15</u>		61,0	-14,6	-1,8
<u>12</u> / <u>15</u>		74,9	-0,7	-0,1
<u>11</u> / <u>16</u>		69,8	-5,8	-0,8
<u>12</u> / <u>16</u>		73,2	-2,4	-0,4
<u>14</u> / <u>16</u>		67,8	-7,8	-0,8
<u>11</u> / <u>17</u>		66,0	-9,4	-0,9
<u>12</u> / <u>17</u>		74,3	-1,3	-0,1
<u>13</u> / <u>17</u>		73,0	-2,6	-0,2
<u>14</u> / <u>17</u>		66,9	-8,7	-0,7
<u>12</u> / <u>18</u>		69,0	-6,6	-0,7
<u>13</u> / <u>18</u>		66,0	-9,6	-0,7
<u>14</u> / <u>18</u>		67,3	-8,3	-0,6

Tableau 4 : Valeurs des T_m des siARNs modifiés avec les groupements 2'-O-BnSSM

^aValeur de T_m obtenu par spectrophotométrie UV à 260 nm. $C_{ARN} = 1,5 \mu M$, tampon = cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM pH 7. La valeur obtenue correspond à la moyenne de 2 cycles dénaturation / hybridation (gradient entre 0 °C et 90 °C). Erreur estimée : $T_m = \pm 0,5$ °C

^b ΔT_m = Différence entre la valeur de T_m du duplex et la valeur de T_m du duplex siEF 1 / 2 non modifié

^cValeur de ΔT_m rapportée au nombre de modifications 2'-O-BnSSM portées par le duplex

Tous les duplex étudiés présentent une courbe sigmoïdale avec une transition nette montrant une bonne coopérativité dans l'hybridation des brins sens et antisens, quels que soient le nombre et le positionnement des modifications (**Figure 15**). A l'exception du duplex 12 / 2 pour lequel une légère stabilisation ($\Delta T_m = + 0,9$ °C) est observée, tous les siARNs sont

moins stables que le siARN non modifié **1** / **2**, de $-0,7$ °C (pour **12** / **15**) à $-14,6$ °C (pour **11** / **15**). Cet effet est néanmoins à nuancer en considérant ces valeurs rapportées au nombre de modifications du siARN, la déstabilisation n'étant que d'environ 1 °C par modification.

Une relation entre les déstabilisations et les positions des modifications a été identifiée. Les valeurs de ΔT_m / modification autour de -2 °C pour les duplex **11** / **2** et **11** / **15** indiquent que les modifications à l'extrémité 5' du brin sens sont plus déstabilisantes. A l'inverse, la légère stabilisation du duplex **12** / **2** par rapport au duplex non modifié montre un effet bénéfique des modifications introduites à l'extrémité 3' du brin sens. Cet effet n'est pas retrouvé avec le duplex **1** / **16** comportant le brin antisens modifié à l'extrémité 3' et présentant un ΔT_m / modification de $-1,2$ °C. Les ARNs formés du brin sens **13**, avec des modifications aux deux extrémités, affichent des valeurs de ΔT_m / modification comprises entre $-0,9$ °C et $-0,2$ °C. A l'inverse, les duplex formés du brin sens **11**, avec des modifications uniquement à l'extrémité 5', engendrent entre $-2,1$ °C et $-0,8$ °C de déstabilisation par modification. Ces résultats montrent que les modifications sur le brin sens du siARN du sarcome d'Ewing ont une influence importante sur la stabilité thermique des duplex. Les modifications à l'extrémité 3' sont favorables, alors qu'à l'inverse, les modifications à l'extrémité 5' sont déstabilisantes.

Enfin, tous les duplex fortement modifiés, avec plus de dix groupements BnSSM répartis sur les deux brins, c'est-à-dire les siARNs **14** / **16**, **11** / **17**, **13** / **17**, **14** / **17**, **12** / **18**, **13** / **18** et **14** / **18**, ont des stabilités très similaires, avec des valeurs de ΔT_m comprises entre $-0,7$ °C et $-0,8$ °C, quel que soit leur positionnement sur les brins sens ou antisens. Ce résultat confirme la possibilité d'introduire un grand nombre de modifications BnSSM sur les siARNs en position 2' tout en gardant une stabilité thermique satisfaisante.

Toutes les valeurs de T_m sont supérieures à 60 °C, confirmant une stabilité thermique à 37 °C suffisante pour permettre l'évaluation des siARNs dans les cellules.

[3.4.2. Etude de la conformation des siARNs par dichroïsme circulaire](#)

Les empreintes spectrales des 21 siARNs ont été déterminées par dichroïsme circulaire. Cette technique de spectropolarimétrie permet de distinguer des différences de conformations de biomolécules telles que des peptides ou des acides nucléiques. Dans le cas des oligonucléotides, l'empreinte spectrale est spécifique de la nature de l'hélice des duplex : forme A pour des ARNs et forme B pour des ADNs. La détermination de la structure des siARNs modifiés est importante car la forme A est nécessaire pour engendrer l'ARN interférence dans la cellule.

Nous avons comparé les siARNs modifiés au duplex **1** / **2** non modifié pour suivre les variations de la forme de l'hélice A. Cette empreinte est caractérisée par une bande positive intense autour de 265 nm et une bande négative intense autour de 210 nm.

Le maintien de la forme d'hélice A pour tous les duplex est observé, comme en attestent la conservation des bandes caractéristiques par rapport au duplex non modifié (courbe noire) (**Figure 16**). Néanmoins, une diminution de l'intensité de la bande positive à 265 nm est à noter, en particulier pour les duplex **13 / 17**, **13 / 18**, **14 / 17** et **14 / 18** portant six ou sept modifications sur chaque brin. Il peut s'agir d'une conséquence du nombre important de modifications sur le duplex, engendrant un effet sur l'empilement des bases de l'ARN, tout en conservant la géométrie globale de l'hélice.

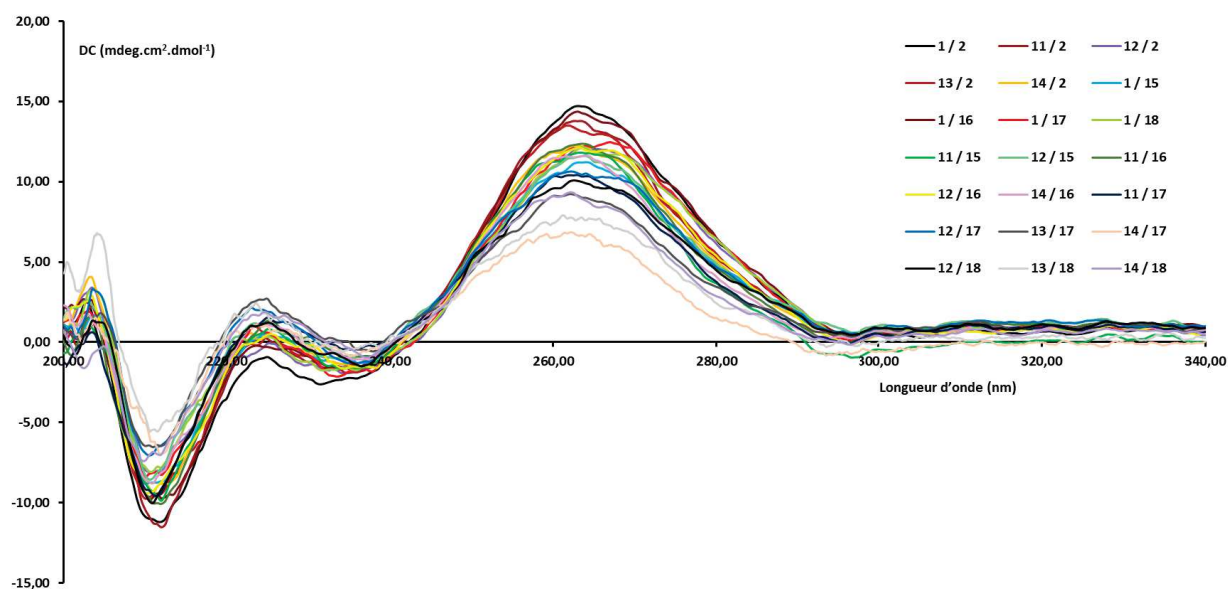


Figure 16 : Spectres de dichroïsme circulaire des siARNs modifiés en comparaison avec le duplex non modifié **1 / 2**

$C_{ARN} = 1,5 \mu M$, tampon = cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM pH 7. Moyennes de 2 mesures. Température d'analyse : 1 °C

3.4.3. Etude de la stabilité des siARNs modifiés en présence de sérum

Une limitation très problématique des siARNs naturels est leur sensibilité aux nucléases. Pour vérifier si les modifications BnSSM permettent l'augmentation de la stabilité enzymatique, les siARNs modifiés ont été incubés en présence de sérum afin de simuler les conditions enzymatiques extracellulaires. Les différentes analyses ont été effectuées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. En travaillant à pH constant, l'électrophorèse permet de séparer les échantillons en fonction de leur taille, et donc de distinguer des duplex selon leur longueur : les dégradations enzymatiques engendrent des siARNs plus courts, dont la migration est plus importante que celle du duplex de départ. La demi-vie des différents siARN est ensuite déterminée par quantification des bandes correspondantes au siARN intact.

3.4.3.1. *Etude en sérum humain*

La stabilité enzymatique a tout d'abord été évaluée après incubation des siARNs en présence de 10% de sérum humain pendant 8 h à 37 °C. L'analyse par électrophorèse a été

effectuée à différents temps d'incubation (1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min, 480 min). Pour chaque analyse, une référence avec le duplex incubé en l'absence de sérum est également réalisée pour évaluer la dégradation chimique des ARNs. Les demi-vies sont compilées dans le **Tableau 5**.

Comme attendu, le duplex non modifié **1 / 2** est très rapidement dégradé et possède une demi-vie inférieure à 5 min (**Figure 17**). Aucune amélioration de la stabilité n'est engendrée par les modifications à l'extrémité 5', les duplex **11 / 15** (**Figure 17**), **11 / 2** ou **1 / 15** portant ces modifications sont très rapidement dégradés et possèdent également une demi-vie inférieure à 5 min. Il a été rapporté qu'en sérum humain, la dégradation commence préférentiellement par l'extrémité 3'.¹³⁷ L'absence d'amélioration de la stabilité due aux groupements BnSSM à l'extrémité 5' uniquement est donc cohérente avec la littérature.

En revanche, les modifications aux extrémités 3' seules, aux deux extrémités ou réparties sur chaque brin des siARNs ont effectivement permis l'augmentation de la stabilité enzymatique. La plus grande résistance est obtenue pour le duplex **14 / 18**, avec sept modifications sur chaque brin, qui présente une demi-vie de 316 min (**Figure 17**). Mis à part les siARNs formés des brins **11** ou **15** modifiés à l'extrémité 5', un seul siARN (**1 / 18**) a subi une forte dégradation. Tous les autres duplex ont une demi-vie augmentée. En particulier, huit siARNs ont présenté des demi-vies supérieures à 1 h.

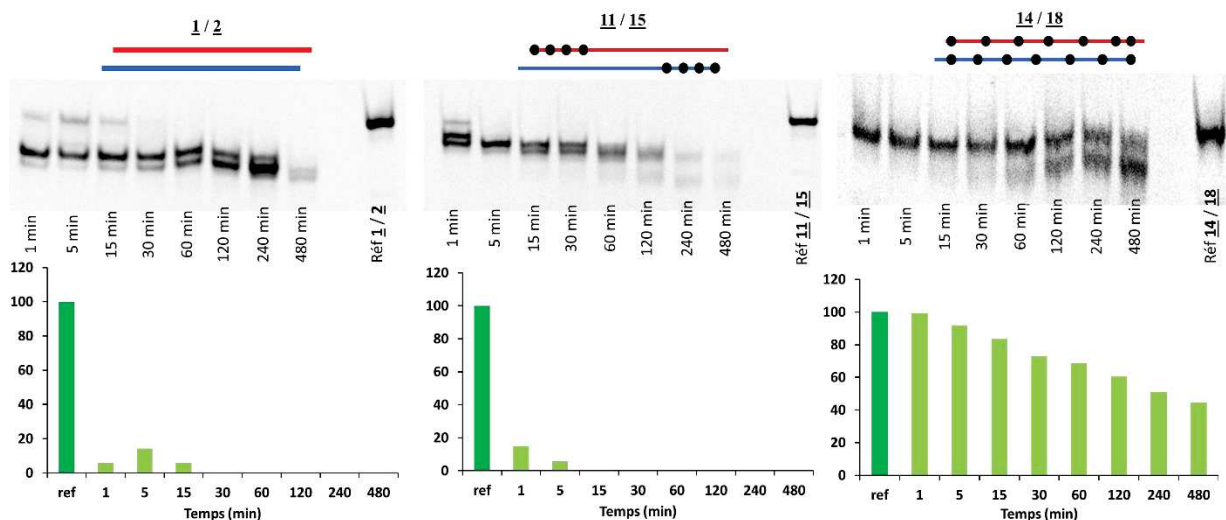


Figure 17 : Gels d'électrophorèse et suivi de la dégradation en sérum humain des duplex non modifiés **1 / 2** et modifiés par des groupes BnSSM en 5' **11 / 15** ou réparties sur la séquence **14 / 18**

Il a été rapporté dans la littérature des sites de coupure préférentiels des siARNs par les nucléases. En effet, les couples de nucléotides UA/AU sont décrits comme particulièrement sensibles aux enzymes. Modifier ces positions, en particulier sur l'uridine, améliore significativement la stabilité du siARN.¹³⁸ Ce couple de nucléosides est présent sur le siEF-4 d'intérêt (**Figure 18**). Les dégradations très rapides observées en sérum sur le siARN **11 / 15**, qui ne possède aucun groupe BnSSM sur ces uridines, confirment cette observation. En revanche, les duplex (**14 / 2**, **12 / 16**, **12 / 17**, **13 / 17**, **14 / 17**, **12 / 18**, **13 / 18**, **14 / 18**)

possédant une modification BnSSM sur cette uridine du brin sens montrent une nette amélioration de leur stabilité enzymatique.



Figure 18 : Site sensible aux coupures par les nucléases sur la séquence du duplex siEF-4

N°	Duplex étudié	Demi-vie en sérum humain (min) ^a	Demi-vie en sérum de veau foetal (min) ^a
siEF-4 (<u>1</u> / <u>2</u>)		< 5	137
<u>11</u> / <u>2</u>		< 5	-
<u>12</u> / <u>2</u>		19	
<u>13</u> / <u>2</u>		37	
<u>14</u> / <u>2</u>		174	> 480
<u>1</u> / <u>15</u>		< 5	-
<u>1</u> / <u>16</u>		12	-
<u>1</u> / <u>17</u>		28	-
<u>1</u> / <u>18</u>		< 5	-
<u>11</u> / <u>15</u>		< 5	< 5
<u>11</u> / <u>16</u>		23	-
<u>12</u> / <u>16</u>		84	242
<u>14</u> / <u>16</u>		54	-
<u>12</u> / <u>17</u>		83	> 480
<u>13</u> / <u>17</u>		92	110
<u>14</u> / <u>17</u>		79	> 480
<u>12</u> / <u>18</u>		125	216
<u>13</u> / <u>18</u>		82	72
<u>14</u> / <u>18</u>		316	> 480

Tableau 5 : Demi-vies calculées pour les siARNs en présence de 10% de sérum humain ou de SVF
^a Calcul de la demi-vie sous l'hypothèse d'une cinétique enzymatique d'ordre 1 de la forme $y = Ae^{-kt}$ modélisée par Microsoft Excel. Coefficients de corrélation : $0,90 \leq R^2 \leq 1,00$

Modélisation non effectuée pour les duplex trop rapidement dégradés par manque de points expérimentaux et pour les duplex trop stables (quantité de produit non dégradé > 50% après 8h)

3.4.3.2. Etude en sérum de veau fœtal

Pour conforter les résultats en sérum humain, nous avons étudié la stabilité des duplex en présence de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), utilisé dans le milieu de culture des cellules A673 du sarcome d'Ewing lors des tests d'ARN interférence.

Le siARN non modifié **1 / 2** et les siARNs modifiés **14 / 2**, **12 / 16**, **12 / 17**, **13 / 17**, **14 / 17**, **12 / 18**, **13 / 18**, et **14 / 18** présentant une demi-vie en sérum humain supérieure à 1 h ont été testés. Le siARN **11 / 15** avec une demi-vie inférieure à 5 min a également été sélectionné, pour comparer les résultats obtenus sur les huit duplex stables et un ARN rapidement dégradé. Comme précédemment, la stabilité de ces siARNs a été suivie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Dans ces conditions, le duplex non modifié **1 / 2** est plus stable que dans le sérum humain, avec une demi-vie de 137 min (**Figure 19, Tableau 5**). Les siARNs apparaissent donc moins sensibles au SVF qu'au sérum humain, ce qui est un avantage pour les tests cellulaires, étant donné que les cellules sont cultivées dans ce sérum. Pour le duplex **11 / 15**, instable dans le sérum humain, une dégradation très rapide est également observée avec une demi-vie inférieure à 5 min, indiquant une plus forte sensibilité aux nucléases que le duplex non modifié. Ce résultat confirme l'hypothèse que les modifications BnSSM à l'extrémité 5' engendrent une modification déstabilisante (**Figure 19**). Cette tendance avait déjà été observée lors de la mesure des températures de fusion, les modifications à cette extrémité étant responsables des plus fortes déstabilisations.

Tous les autres siARNs sont plus stables dans le SVF que dans le sérum humain. Pour quatre duplex (**14 / 2**, **12 / 17**, **14 / 17**, **14 / 18**), plus de 50% de l'ARN reste intact après 8 h d'incubation, confirmant la stabilisation déterminée en sérum humain par rapport au siARN non modifié. En particulier, pour le siARN **14 / 18**, moins de 20% de dégradations sont observables après 8 h, démontrant une très grande stabilité dans ces conditions.

Pour la suite des évaluations des siARNs modifiés, nous avons décidé de conserver uniquement les huit duplex avec une stabilité enzymatique fortement améliorée : **14 / 2**, **12 / 16**, **12 / 17**, **13 / 17**, **14 / 17**, **12 / 18**, **13 / 18**, **14 / 18**. Un seul duplex (**14 / 2**) ne possédant aucun groupement BnSSM sur le brin antisens a été sélectionné. A l'inverse, tous les autres sont modifiés sur les brins sens et antisens, et permettent de comparer l'influence des groupements sur le brin antisens sur l'activité biologique d'ARN interférence.

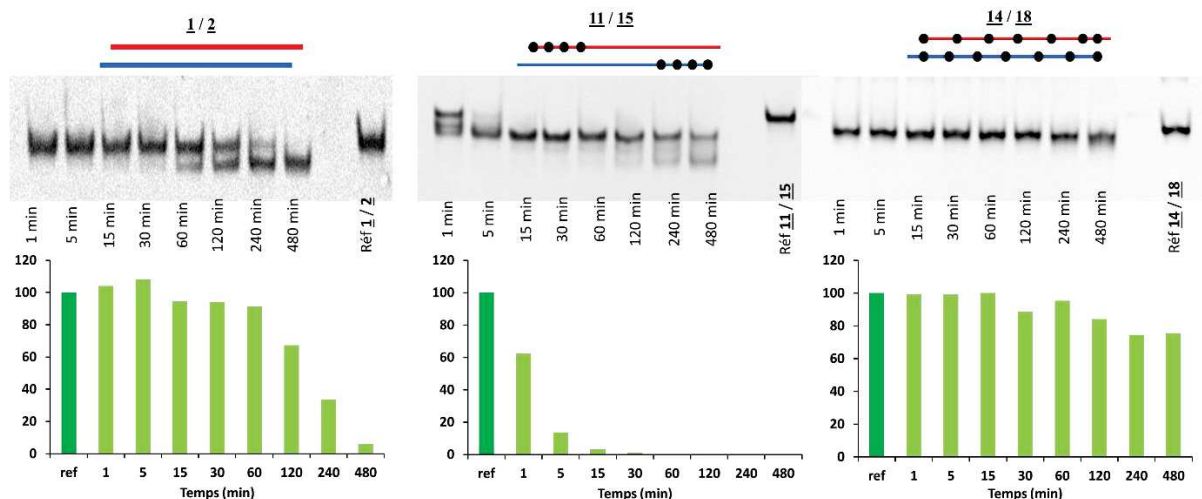


Figure 19 : Gels d'électrophorèse et suivi de la dégradation en SVF des duplex non modifiés 1 / 2 et modifiés avec des modifications en 5' 11 / 15 ou réparties sur la séquence 14 / 18

3.4.4. Démasquage des siARNs en présence de glutathion

Bien que l'augmentation de la stabilité des siARNs 2'-O-BnSSM modifiés soit un critère important dans l'efficacité de l'approche prodrogue, le démasquage des siARNs en milieu réducteur est primordial pour valider cette approche. Ainsi, les huit duplex sélectionnés ont été incubés à 37 °C en présence de glutathion (GSH) à 5,6 mM dans un tampon HEPES à pH 8 pendant 24 h. Des prélèvements ont été réalisés à 1 min, 1 h, 2 h, 4 h et 8 h pour suivre le démasquage des siARNs par IEX-HPLC (**Figure 20**).

Après 1 min, les chromatogrammes montrent la disparition du pic correspondant au siARN étudié, indiquant la coupure très rapide des ponts disulfures quel que soit le duplex. Cette coupure induit la libération des intermédiaires hémithioacétals, puis l'évolution pour régénérer le 2'-OH est très différente selon les duplex. Sur des durées inférieures à 2 h, peu de différences apparaissent. En revanche, à 4 h, les pics correspondants aux siARNs totalement démasqués sont peu présents (< 20%) (**Figure 21**). Des massifs de pics larges sont à noter et ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ils correspondent à des mélanges de molécules d'ARNs portant des hémithioacétals en diverses positions. En effet, à pH 8, la forme thiol SH, stable, est en équilibre avec la forme thiolate S⁻, pouvant expliquer la cinétique de départ lente du thioformaldéhyde.^{84, 88} Le duplex 12 / 16 fait néanmoins exception. Après 4h d'incubation avec le GSH, environ 90% de siARN non modifié est régénéré. Le faible nombre de modifications BnSSM sur le duplex et leur positionnement très éloigné (trois groupes à l'extrémité 3' de chaque brin) favorisent le départ des groupements et explique la vitesse de démasquage rapide (**Figure 21**).

Chapitre I : Synthèse de prodrogues de siARNs modifiées par des groupements 2'-O-benzylthiométhyles

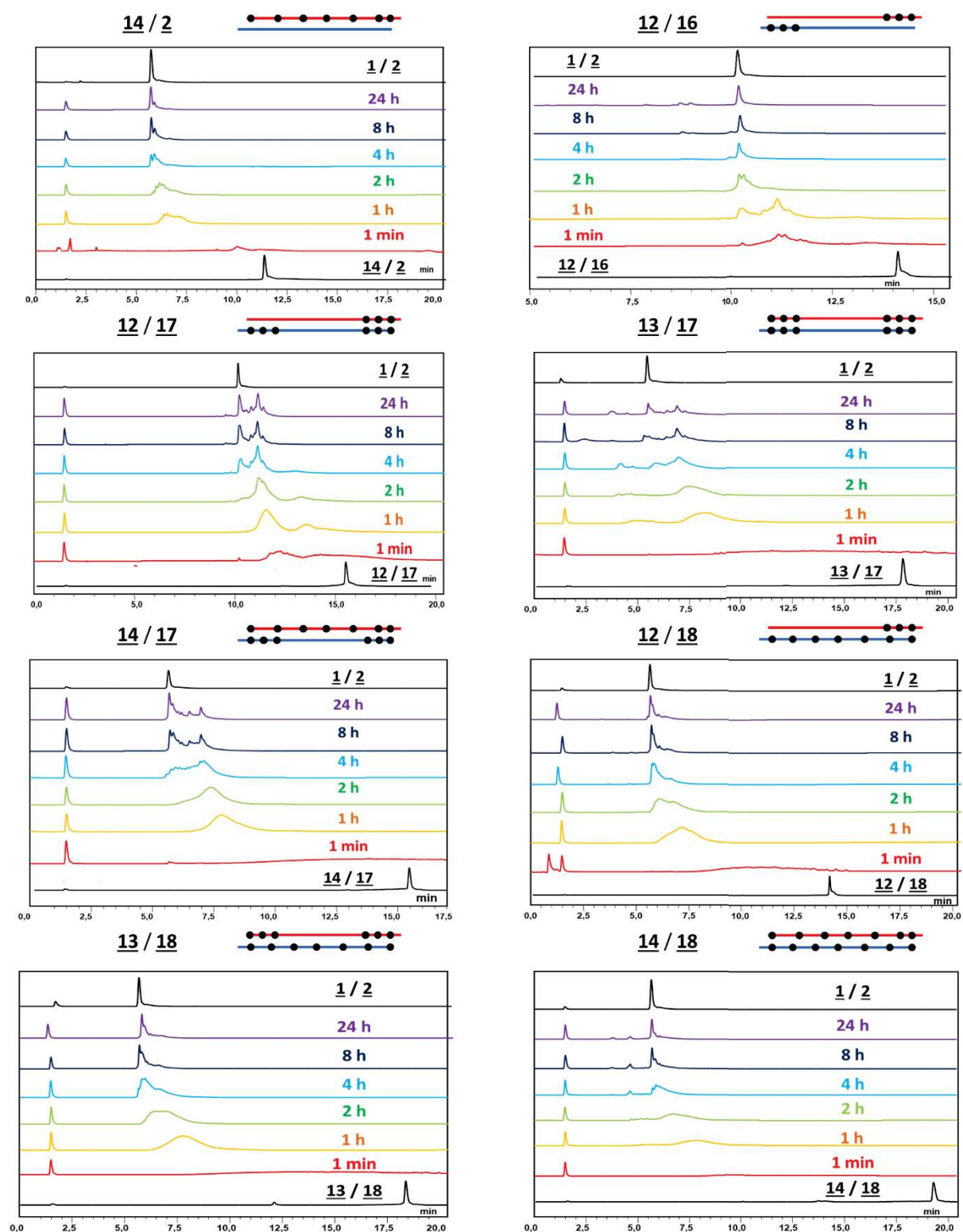


Figure 20 : Chromatogrammes IEX-HPLC des cinétiques de démasquage des siARNs sélectionnés dans 5,6 mM de GSH dans un tampon (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,05 mM EDTA, 7,5 mM HEPES, pH 8)

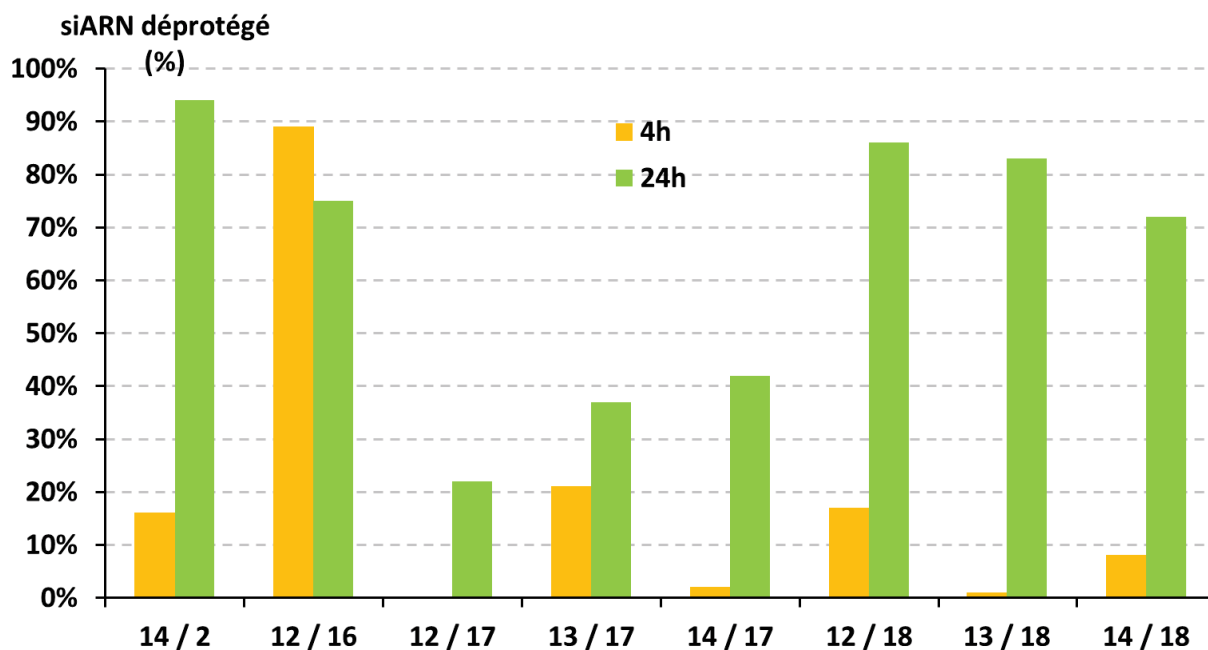


Figure 21 : Démasquage des siARN modifiés après 4 h et 24 h d'incubation dans 5,6 mM de GSH dans un tampon (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,05 mM EDTA, 7,5 mM HEPES, pH 8)

A l'inverse, au regard des résultats après 24h, des différences significatives sont obtenues en fonction des siARNs. Par exemple, les duplex 14 / 2, 12 / 18 et 13 / 18, sont démasqués à plus de 80% alors que 12 / 17, 13 / 17 et 14 / 17 ne le sont qu'à 40%. Une exception est à noter pour 12 / 16, pour lequel la proportion de 2'-OH diminue entre 4 h et 24 h en raison d'un début de dégradation chimique du siARN, constaté à partir de 8 h.

En étudiant plus en détail le positionnement des groupements BnSSM, l'efficacité du démasquage semble liée au nombre de modifications portées par des nucléotides appariés dans le duplex (**Tableau 6**). En effet, pour 14 / 2, présentant uniquement des modifications BnSSM sur le brin sens, 94% du siARN natif est récupéré après 24 h. De plus, les siARNs 13 / 18 et 14 / 18, qui portent deux nucléotides appariés et modifiés en 2' sont rapidement démasqués. En revanche, pour 12 / 17, 13 / 17 et 14 / 17, qui présentent respectivement trois, six et quatre nucléotides appariés modifiés, le démasquage est faible avec respectivement 22%, 42% et 37%.

Une explication possible à cette différence de démasquage des siARNs serait la formation de ponts disulfures interbrins à partir de deux hémithioacétals. Une telle liaison serait stable et moins accessible au glutathion, expliquant les difficultés de démasquage observées. Ce comportement pourrait induire une réponse biologique différée selon le positionnement et le nombre des modifications, en conséquence du temps requis pour récupérer les siARNs 2'-OH.









N°	Duplex étudié	Nombre de nucléosides 2'-O-BnSSM appariés	Proportion de siARN démasqué après 24 h (%)
<u>14 / 2</u>		0	94 %
<u>12 / 16</u>		0	75 %
<u>12 / 17</u>		3	22 %
<u>13 / 17</u>		6	37 %
<u>14 / 17</u>		4	42 %
<u>12 / 18</u>		1	86 %
<u>13 / 18</u>		2	83 %
<u>14 / 18</u>		2	72 %

Tableau 6 : Nombre de modifications sur des nucléotides 2'-O-BnSSM appariés sur les duplex sélectionnés et proportions de siARN démasqué après 24 h

3.4.5. Démasquage des siARNs en extraits cellulaires

Le milieu cellulaire ne se compose pas uniquement de tampon contenant une forte concentration de glutathion. Pour conforter ces résultats, nous avons donc suivi par IEX-HPLC le devenir du duplex 12 / 16 après incubation dans des extraits cellulaires. Il s'agit du seul duplex sélectionné qui ne possède pas de modifications BnSSM sur des nucléosides appariés, empêchant ainsi la formation potentielle de liaisons interbrins. Deux lignées cellulaires humaines ont été utilisées : les cellules A673 du sarcome d'Ewing¹³⁹ et les cellules Huh-7 issues d'une tumeur hépatique, qui contiennent théoriquement une forte concentration de glutathion.¹⁴⁰

Les milieux d'incubation ont été analysés par HPLC en utilisant au préalable une filtration en ligne par une technique mise au point au laboratoire.¹⁴¹ Dans un premier temps, le milieu réactionnel est injecté sur une pré-colonne C-18 phase inverse pour éliminer les protéines contenues dans les extraits cellulaires. Puis, à l'aide d'une vanne rhéodyne, les composés de nature nucléosidique fixés sur la colonne C-18 sont transférés sur une colonne analytique échangeuse d'ions afin de les séparer.

Le duplex 12 / 16 a d'abord été incubé dans les extraits des cellules Huh-7 pendant 24 h à 37 °C (**Figure 22**). Des prélèvements ont été réalisés après 1 min, 1 h, 3 h, 6 h et 24 h pour suivre l'évolution. Comme avec le glutathion, la disparition du pic correspondant au duplex de départ est rapidement observée, indiquant une coupure rapide des ponts disulfures. Un mélange d'intermédiaires hémithioacétals est obtenu, en quantités plus importantes qu'avec le glutathion seul, pouvant indiquer une cinétique de départ du thioformaldéhyde plus lente. Après 24 h, le duplex totalement démasqué n'est présent qu'à 10%, alors que les intermédiaires sont encore présents sur le chromatogramme.

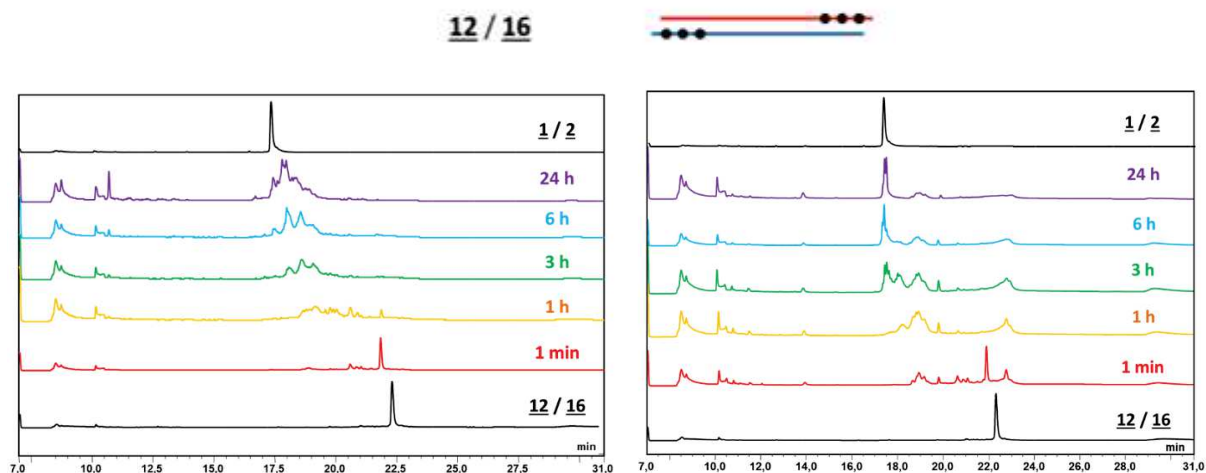


Figure 22 : Chromatogrammes IEX-HPLC des cinétiques de démasquage du siARN **12 / 16** incubés dans les extraits cellulaires des cellules Huh-7 (à gauche) et A673 (à droite)

La même expérience a été réalisée sur le duplex **12 / 16** avec les extraits des cellules A673 du sarcome d'Ewing (**Figure 22**). La cinétique de démasquage est beaucoup plus rapide puisque le pic du siARN totalement démasqué représente 51% après uniquement 6 h. Cette proportion augmente même à 72% après 24 h. Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus en présence de 5,6 mM de glutathion en milieu tamponné. Le démasquage plus efficace dans les cellules A673 semble indiquer une différence de composition ou de concentration en glutathion des deux extraits. Cependant, ce résultat a permis de démontrer qu'en extraits cellulaires, le démasquage a lieu, en particulier avec les cellules A673 de notre cible biologique, et ainsi d'envisager de tester l'activité des siARNs modifiés en cellules.

3.5. Evaluation biologique des différents siARNs sélectionnés

Dans le cadre de notre collaboration avec le Dr. Jean-Rémi Bertrand, les huit siARNs sélectionnés (**14 / 2**, **12 / 16**, **12 / 17**, **13 / 17**, **14 / 17**, **12 / 18**, **13 / 18** et **14 / 18**) ont été testés sur l'inhibition de l'expression de la protéine EWS-Fli1 du sarcome d'Ewing. Le duplex **11 / 15**, le plus instable en sérum, a également été testé pour évaluer l'influence de la stabilité enzymatique sur la réponse biologique.

3.5.1. Activité en présence d'agents de transfection

Nous avons tout d'abord étudié l'inhibition de l'expression de EWS-Fli1 par les cellules A673 en présence d'un agent de transfection. Les siARNs ont été utilisés à une concentration de 50 nM, en présence de Lipofectamine 2000®, un agent de transfection formant des liposomes cationiques, capables de se lier par interaction électrostatique avec les oligonucléotides chargés négativement pour les aider à traverser efficacement les membranes cellulaires.¹⁴² La capacité d'inhibition des siARNs a été mesurée après 24 h par RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction). Cette technique permet

d'évaluer l'inhibition apportée par les siARNs en dosant quantitativement les ARNm présents dans la cellule. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été lysées et les ARNs récupérés ont été retranscrits en ADN, en utilisant l'enzyme transcriptase inverse. Ensuite, ils ont été amplifiés par PCR en utilisant une amorce spécifique de la séquence de l'ADN codant pour la protéine EWS-Fli1.

Dans ces conditions, le siARN non modifié 1 / 2 montre 80% d'inhibition de l'expression de EWS-Fli1. Tous les siARNs modifiés, y compris le duplex le moins stable 11 / 15, ont une activité biologique, comprise entre 68% pour 14 / 18 et 88% pour 14 / 2 (Figure 23). L'activité de tous les siARNs tend à confirmer leur démasquage effectif dans les cellules. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Urata *et al.*¹³², qui a aussi décrit une activité avec des siARNs aux deux brins modifiés, et en particulier sur le brin antisens impliqué dans le complexe RISC.

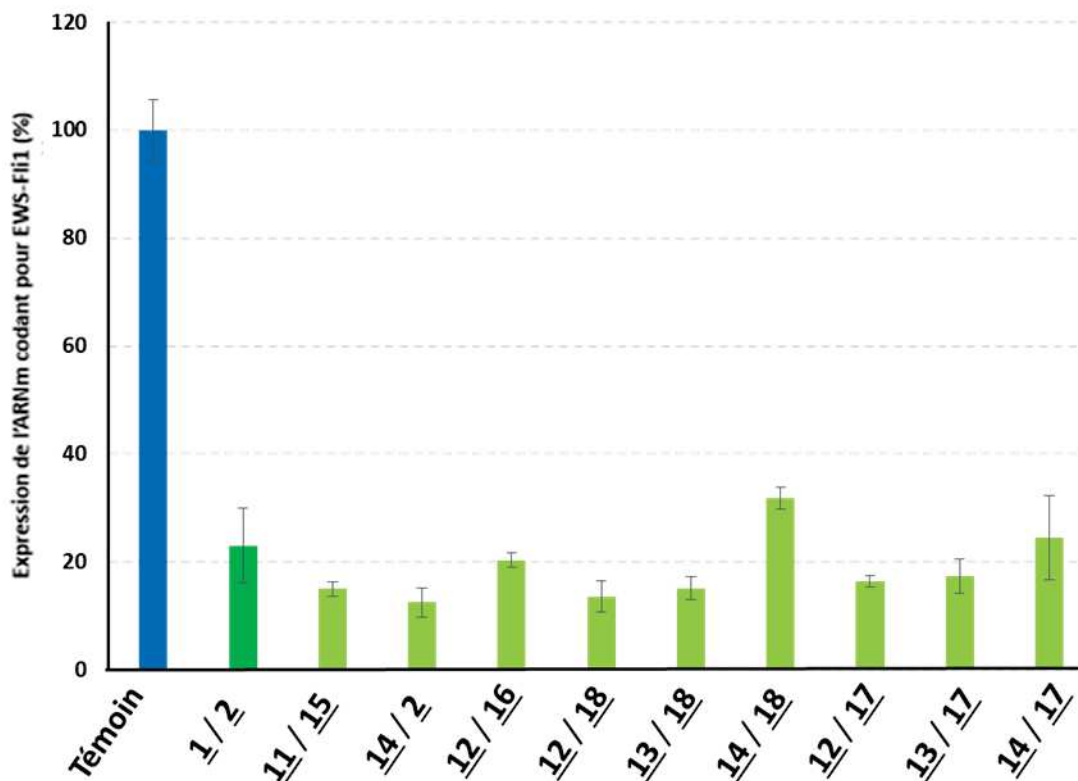


Figure 23 : Expression de l'ARNm codant pour EWS-Fli1 dans les cellules incubées avec les siARNs en présence de Lipofectamine®

$C_{ARN} = 50$ nM, transfection avec de la Lipofectamine® dans du milieu OptiMEM sans sérum puis une incubation dans le milieu DMEM 10% SVF

Témoin correspondant à l'expression de l'ARNm sans traitement des cellules

Expressions exprimées en pourcentage du témoin obtenu avec des cellules non traitées, mesurées en triplicat et normalisées par l'expression de la G3PDH

Temps de transfection : 2 h ; temps d'incubation : 24 h

Le siARN 14 / 2, présentant la meilleure activité, ne possède toutefois pas de modifications sur le brin antisens. Cette réponse biologique peut s'expliquer par la

disponibilité immédiate du brin antisens pour le complexe RISC. A l'inverse, le duplex le moins actif est le siARN **14** / **18** portant le plus grand nombre de modifications (14), avec sept groupements BnSSM sur le brin sens et le brin antisens. Une explication potentielle est la cinétique de démasquage plus lente pour récupérer le siARN natif qui doit exercer son action d'inhibition dans les cellules.

3.5.2. Activité en l'absence d'agents de transfection

Pour évaluer l'apport des modifications BnSSM sur une amélioration de la pénétration cellulaire des siARNs, les mêmes expériences ont été réalisées en absence de Lipofectamine®. L'expression de EWS-Fli1 a une nouvelle fois été mesurée par RT-qPCR après 24 h d'incubation, avec une concentration de 500 nM en siARNs.

Dans ces conditions, le siARN naturel **1** / **2** ne montre pas d'activité significative, corroborant l'incapacité des siARNs non modifiés à pénétrer dans les cellules sans agent de transfection. De même, les siARNs modifiés **12** / **16**, **12** / **17**, **13** / **17**, **12** / **18**, **13** / **18** et **14** / **18** ne démontrent pas de résultats d'interférence notables. En revanche, les duplex **14** / **2** et **14** / **17**, comportant le même brin sens **14** avec sept modifications BnSSM, présentent respectivement des inhibitions de 50% et 30% (**Figure 24**).

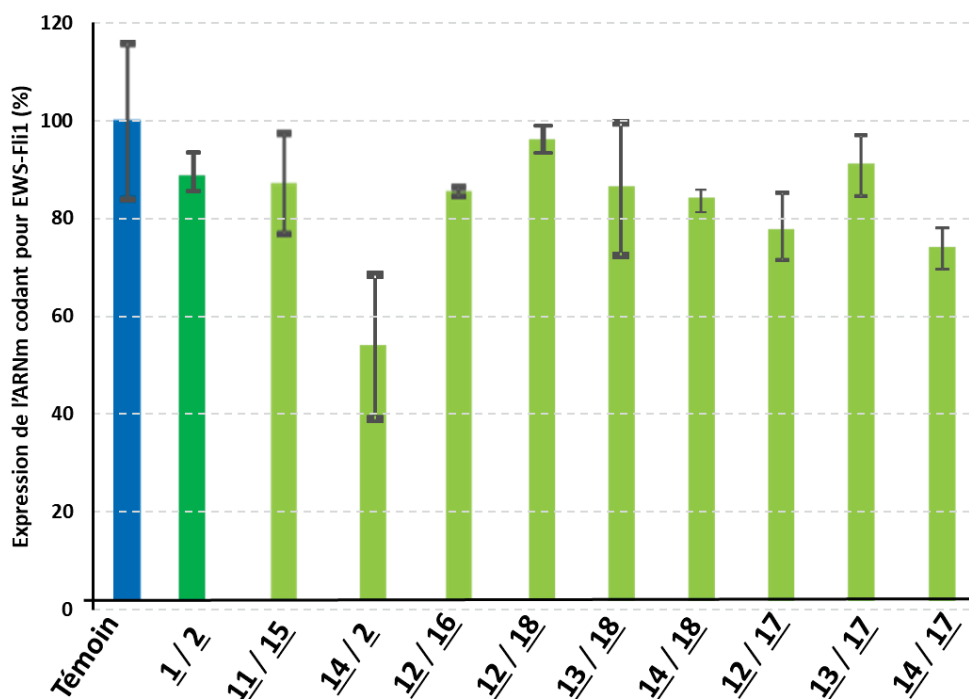


Figure 24 : Expression de l'ARNm codant pour EWS-Fli1 dans les cellules incubées avec les siARNs en absence d'un agent de transfection

$C_{ARN} = 500 \text{ nM}$, incubation dans le milieu DMEM 10% SVF

Témoin correspondant à l'expression de l'ARNm sans traitement des cellules

Expressions exprimées en pourcentage du témoin obtenu avec des cellules non traitées, mesurées en triplicat et normalisées par l'expression de la G3PDH

Temps d'incubation : 24 h

Comme le siARN **14 / 2** est le plus actif en présence de Lipofectamine®, nous pouvons supposer que les sept groupements BnSSM présents sur le brin sens **14** apportent la lipophilie nécessaire au siARN pour faciliter sa pénétration cellulaire. Cet effet est cohérent avec des résultats antérieurs du laboratoire, dans lesquels les modifications lipophiles acétalesters 2'-O-PiBuOM, introduites sur le brin sens uniquement, permettaient une augmentation de la pénétration cellulaire du siARN et le maintien de l'activité biologique.¹³⁰ Néanmoins, l'inhibition est largement inférieure à celle détectée en présence d'un agent de transfection.

De plus, pour le même brin sens **14**, des résultats variables sont obtenus selon le nombre de modifications sur le brin antisens. En comparant les trois siARNs avec ce brin **14**, **14 / 2** (aucune modification sur le brin antisens), **14 / 17** (six modifications sur le brin antisens) et **14 / 18** (sept modifications sur le brin antisens), des inhibitions respectives de 50%, 25% et 18% sont obtenues. Le pourcentage d'inhibition est décroissant avec l'augmentation du nombre de groupes BnSSM. Ces résultats confortent l'hypothèse que la cinétique de démasquage joue un rôle important dans l'efficacité. Urata *et al.* ont observé que des siARNs avec des groupements 2'-O-MDTM présentaient la meilleure activité après 96 h d'incubation.¹³³ Ainsi, l'activité de ces trois siARNs a été mesurée après des temps d'incubation plus longs (**Figure 25**).

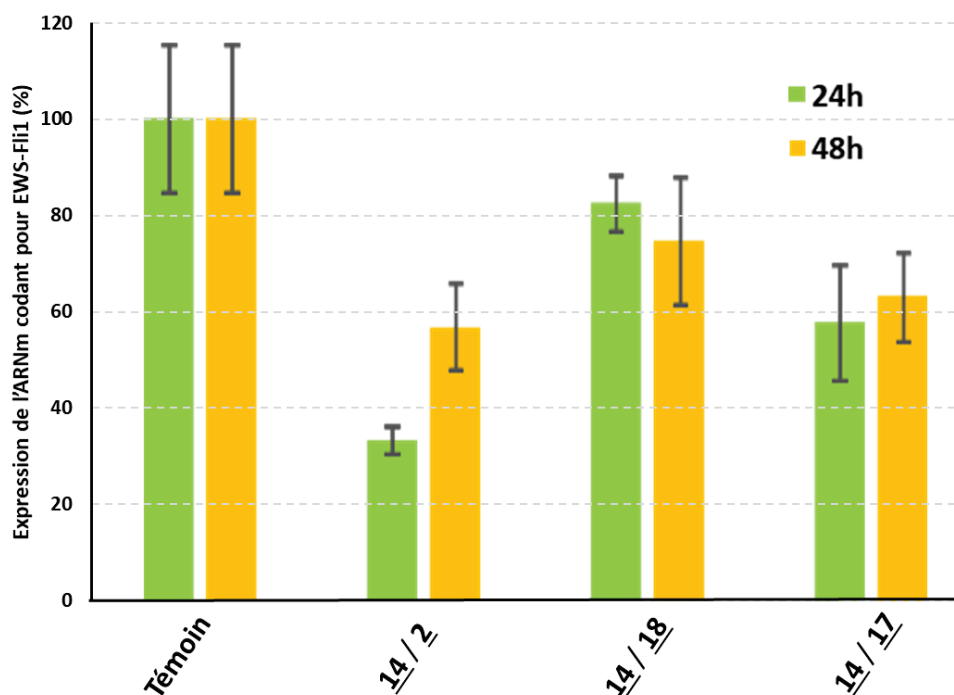


Figure 25 : Expression à 24 h et 48 h de l'ARNm codant pour EWS-Fli1 dans les cellules incubées avec les siARNs **14 / 2**, **14 / 17** et **14 / 18** en absence d'agents de transfection

$C_{ARN} = 500 \text{ nM}$, incubation dans du milieu DMEM 10% SVF

Expressions exprimées en pourcentage du témoin obtenu avec des cellules non traitées, mesurées en triplicat et normalisées par l'expression de la G3PDH

Temps d'incubation : 24 h ou 48 h

Dans un premier temps, pour vérifier si une durée de démasquage plus longue permet de libérer les brins antisens non modifiés pour une action à plus long terme, l'inhibition a été remesurée à 24 h mais également à 48 h.

Lors de cette expérience, après 24 h d'incubation, des résultats similaires ont été obtenus, avec des inhibitions légèrement meilleures, de 65% pour **14 / 2** à 17% pour **14 / 18**. A l'inverse, les différences d'activité sont beaucoup moins marquées après 48 h (**Figure 25**). En effet, le siARN **14 / 2** présente une baisse d'efficacité à 48 h, avec une inhibition de seulement 42% contre 65% à 24 h. En revanche, pour les deux autres siARNs, l'inhibition à 48 h est maintenue avec environ 25% pour **14 / 18** et 40% pour **14 / 17**.

Deux conclusions peuvent être tirées de ce résultat. Tout d'abord, le duplex **14 / 2** avec le brin antisens non modifié est immédiatement utilisable par le RISC, et induit ainsi rapidement une activité notable à 24 h. La dégradation enzymatique dans la cellule entraîne ensuite la baisse d'activité détectée à 48 h. A l'inverse, la conservation de l'efficacité entre 24 h et 48 h pour les duplex modifiés sur le brin antisens **14 / 18** et **14 / 17** tend à confirmer que la cinétique de démasquage lente induit une réponse biologique à plus long terme.

3.5.3. Evaluation des siARNs avec sept modifications sur le brin sens

3.5.3.1. Etude de la toxicité des siARNs

La cytotoxicité des duplex **14 / 2**, **14 / 17** et **14 / 18** a été évaluée en utilisant un test MTT. Ce dernier consiste en une méthode rapide de comptage du nombre de cellules vivantes, permettant d'évaluer si la présence d'inhibiteurs potentiels réduit le nombre de cellules. Les siARNs ont été incubés pendant 24 h en présence des cellules, avant que ces dernières ne soient mises en réaction avec le sel tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) pendant 3 h. Dans les cellules vivantes, le sel tétrazolium est réduit par une déshydrogénase mitochondriale, engendrant une coloration bleue proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Après lyse des cellules, un dosage à 570 nm est réalisé.

Le duplex non modifié **1 / 2** ne présente aucune toxicité pour les cellules (**Figure 26**). A l'inverse, les trois siARNs modifiés entraînent une légère diminution de la viabilité cellulaire, entre 5% et 35%. Le duplex **14 / 18**, avec sept modifications BnSSM sur chaque brin, présente la plus forte diminution (35%). Aucun effet cytotoxique majeur n'est néanmoins détecté, confirmant la possibilité d'utiliser ces siARNs modifiés dans les cellules.

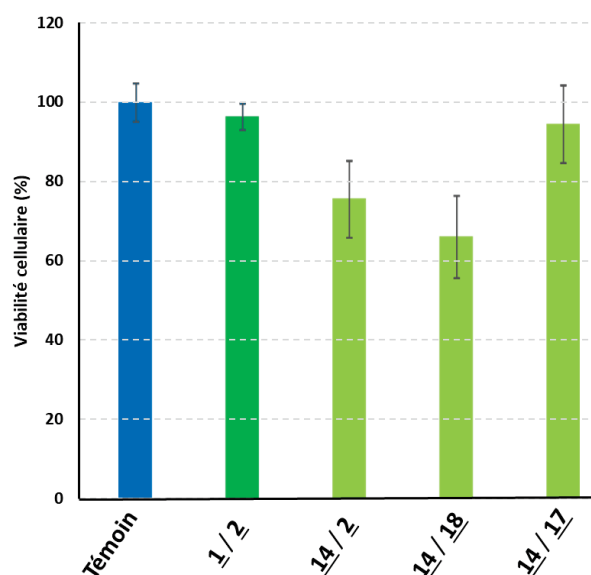


Figure 26 : Comparaison de la viabilité des cellules A673 par test MTT après 24 h d'incubation avec les siARNs **1 / 2**, **14 / 2**, **14 / 17** et **14 / 18**

$C_{ARN} = 500 \text{ nM}$, incubation dans le milieu DMEM 10% SVF

Résultats exprimés en pourcentage du témoin obtenu avec des cellules non traitées

Résultat moyen de six mesures

3.5.3.2. Synthèse des siARNs modifiés marqués avec de la Cy_3

Pour visualiser par microscopie électronique les siARNs dans les cellules, le brin sens modifié **19**, avec sept modifications BnSSM comme le brin sens **14**, et le brin sens non modifié **20** ont été préparés avec le fluorophore Cyanine 3 (**Cy3**), introduit sous la forme du phosphoramidite commercial à leur extrémité 5' (**Tableau 7**).

Brin sens siEF-4S	N°	m/z calculée	m/z obtenue ^a	ARN d'intérêt ^b (%)	Quantités isolées ^c (nmol)
7 BnSSM	19	8360,5	8359,9	21	43
Non modifié	20	7161,6	7161,1	60	96

Tableau 7 : ARNs **19** et **20** marqués à l'extrémité 5' par la **Cy3**

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ($[M-H]$)

^bPourcentage du pic de l'ARN d'intérêt en aire relative du chromatogramme IEX- HPLC du brut de déprotection à 260 nm

^cQuantités isolées après purification mesurées par spectrophotométrie à 260 nm et 550 nm ($\epsilon = 150000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) à partir d'une synthèse à l'échelle 1 μmol

3.5.3.3. Etude de la pénétration cellulaire par microscopie de fluorescence

Les cellules A673 ont été incubées en présence des siARNs **19 / 2**, **19 / 17** et **19 / 18** à une concentration de 500 nM dans du milieu de culture cellulaire, en présence de 10% de sérum de veau fœtal et sans agent de transfection. Après 3 h et 24 h d'incubation, les cellules

ont été observées par microscopie de fluorescence, en prenant pour référence le siARN non modifié **20 / 2**.

L'analyse après 3h d'incubation montre qu'aucune fluorescence n'est obtenue avec le duplex non modifié **20 / 2**, confirmant l'absence de pénétration cellulaire des siARNs non modifiés seuls. Par contre, les images de microscopie révèlent une coloration rouge assez uniforme dans toutes les cellules pour le siARN **19 / 2**, ce qui démontre une pénétration cellulaire très efficace pour ce siARN non modifié sur le brin antisens. Une coloration plus faible est à noter pour les siARNs **19 / 17** et **19 / 18** comportant des groupements BnSSM sur le brin antisens.

Ce résultat est cohérent avec les inhibitions mesurées précédemment, car il corrobore la meilleure activité obtenue avec le siARN **14 / 2** ne portant pas de modifications sur le brin antisens. Néanmoins, une pénétration cellulaire supérieure était attendue pour les deux autres siARNs **19 / 17** et **19 / 18** qui portent le double de modifications lipophiles BnSSM (13 et 14). Une hypothèse pourrait être que la pénétration cellulaire est réduite à partir d'un certain seuil de lipophilie, en raison du blocage des siARNs dans les membranes cellulaires ou de problèmes au niveau de la sortie des endosomes.

Après 24 h, une diminution de la fluorescence pour le duplex **19 / 2** (**Figure 27**) est observée, à nouveau en cohérence avec les résultats obtenus en interférence pour laquelle l'activité à 48 h a diminué par rapport à 24 h. Le renouvellement des protéines prenant plusieurs heures, un délai est nécessaire entre l'entrée dans les cellules et la détection d'un effet biologique. Une approximation possible consiste donc à considérer que le résultat de pénétration cellulaire à 3 h peut correspondre à l'activité à 24 h, et la pénétration à 24 h à l'activité à 48 h. Ainsi, le siARN **19 / 2** pénètre efficacement dans les cellules et engendre une réponse biologique rapide grâce au brin antisens natif. Ensuite, sous l'effet de dégradations enzymatiques, l'effet s'estompe, expliquant la baisse d'activité à 48h. De plus, après dissociation du duplex par le complexe RISC, le brin sens seul est plus sensible aux nucléases. Après dégradation, les résidus de brin sens modifié par la **Cy₃** peuvent donc être excrétés par la cellule entraînant une baisse de fluorescence.

Pour les deux autres siARNs **19 / 17** et **19 / 18**, les fluorescences restent similaires à celles obtenues à 3 h, confirmant des activités constantes entre 24 h et 48 h. La cinétique lente de démasquage des siARNs entraîne donc une réponse biologique différée. En effet, l'obtention des siARNs démasqués est progressive, induisant une incorporation sur le RISC plus faible mais étalée sur une période plus longue, contrairement au duplex **19 / 2** pour lequel un pic d'activité est atteint en moins de 24 h avant une décroissance.

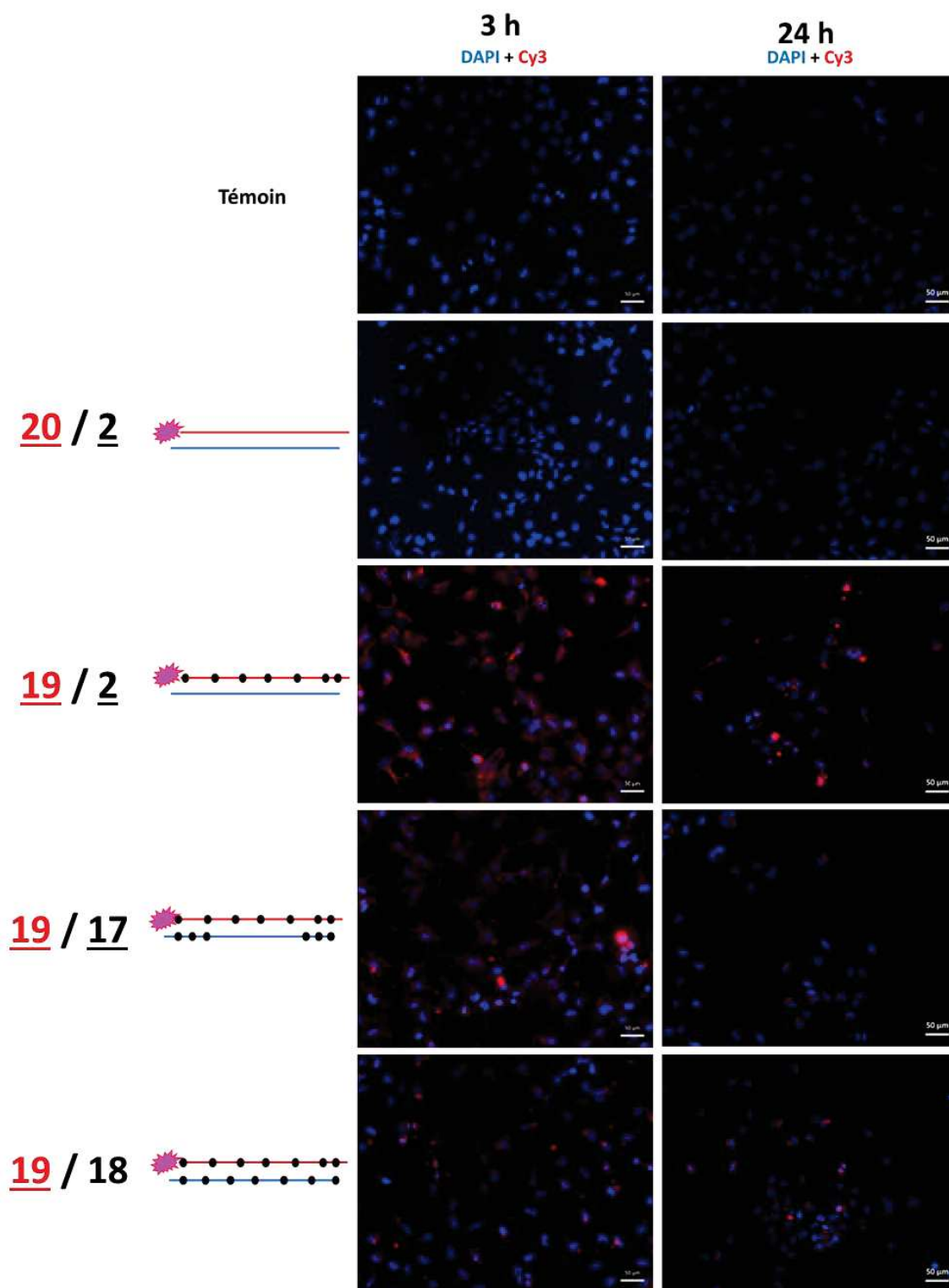


Figure 27 : Images de fluorescence obtenues après 3 h et 24 h d'incubation des siARNs
 $C_{ARN} = 500 \text{ nM}$, incubation à 37°C dans le milieu DMEM 10% de SVF
 Coloration bleue des noyaux par le DAPI, marquage des siARNs en rouge

4. Conclusion

Dans ce chapitre, la synthèse de prodrogues de siARNs mixtes 2'-O-BnSSM / 2'-OH a été réalisée grâce à une méthode utilisant deux types de ribonucléosides phosphoramidites : des synthons 2'-O-PivOM comme précurseur des nucléosides 2'-OH et des synthons 2'-O-AcSM comme précurseur des groupements BnSSM contenant des ponts disulfures. Pour permettre une liberté totale dans le choix des modifications, les quatre phosphoramidites 2'-O-AcSM des nucléosides U, A, G et C ont été synthétisés, autorisant l'introduction de modifications sur n'importe quelle position de l'ARN, en évitant d'avoir deux nucléosides adjacents porteurs de la modification pour ne pas former de pont disulfure intrabrin. Le groupement 2'-O-BnSSM a été sélectionné pour son apport de lipophilie aux ARNs, supposée favoriser la pénétration cellulaire des siARNs.

Des siARNs modifiés ciblant l'ARNm d'une protéine impliquée dans le sarcome d'Ewing ont été synthétisés, avec des modifications 2'-O-BnSSM placées à l'extrémité 5', à l'extrémité 3', aux deux extrémités ou réparties sur toute la séquence, avec des rendements et une pureté satisfaisante. Plusieurs siARNs formés de ces quatre brins sens et quatre brins antisens modifiés ont été obtenus.

La stabilité thermique de ces 21 siARNs modifiés ainsi que leur structuration en hélice A ont été démontrées dans les conditions physiologiques. Leur stabilité enzymatique en sérum a permis de sélectionner huit siARNs possédant une résistance aux nucléases supérieure à 1 h. Nous avons montré que ces siARNs étaient bien démasqués par l'action du glutathion, avec des cinétiques plus ou moins lentes selon les positions de groupes BnSSM dans le siARN. Il semblerait que la présence des modifications sur deux nucléotides appariés ne soit pas favorable à un démasquage rapide et efficace.

De plus, les groupements BnSSM semblent bien éliminés dans les cellules car tous les siARNs modifiés sur les brins sens et/ou antisens ont inhibé efficacement la production de la protéine EWS-Fli1 après transfection dans les cellules avec la Lipofectamine®. Sans agent de transfection, le siARN avec le brin sens modifié par sept groupements BnSSM et le brin antisens non modifié a démontré la plus forte activité à 24 h, corroborée par la meilleure pénétration cellulaire. Pour deux autres siARNs comportant ce même brin sens et un brin antisens modifié, l'activité biologique est similaire à 24 h et à 48 h, perdurant donc dans le temps, certainement en conséquence d'un démasquage lent des siARNs. Les pénétrations cellulaires de ces deux siARNs sont plus faibles mais constantes entre 3 h et 24 h, expliquant l'inhibition à plus long terme.

A la vue des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les siARNs modifiés par les groupements BnSSM remplissent les critères requis pour être des prodrogues de siARNs : ils sont stables dans les fluides biologiques, pénètrent sans agent de transfection dans les cellules où ils sont démasqués, et induisent une inhibition de l'expression de protéines avec peu

d'effet cytotoxique. Néanmoins, cette inhibition n'est pas obtenue dans tous les cas et est fortement dépendante de la position et du nombre de modifications dans le siARN, ce qui influence aussi l'efficacité de la pénétration cellulaire. Cependant, obtenir une activité biologique avec des siARNs modifiés sur le brin antisens est une avancée intéressante, mais les résultats de pénétration cellulaire confirment la nécessité d'un suivi à plus long terme, pour étudier les effets d'un démasquage lent.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (en annexe).¹⁴³

General experimental procedures

Pyridine and DIEA were distilled over calcium hydride and MeOH was distilled over sodium. All other anhydrous solvents are commercial and used as is. All reactions were performed in anhydrous conditions under argon. Thin-layer chromatographies (TLC) were performed on silica plate 60 F₂₅₄ Merck and the different spots were revealed at 254 nm. Column chromatography purifications were performed on silica gel (40 - 63 μm) silica from Merck-Millipore. NMR experiments were accomplished on a Bruker 400 spectrometer or a Bruker 300 spectrometer at 20°C. HRMS analyses were obtained with electrospray ionization (ESI) in positive mode on a Q-TOF Micromass spectrometer.

Analytical and semi-preparative high performance liquid chromatography were performed on a Dionex DX 600 HPLC system equipped with anion-exchange DNAPac PA 100 columns (4 x 250 mm for analysis or 9 x 250 mm for semi-preparative purpose, Dionex), UV detection at 260 nm. The following HPLC solvent systems were used: 20% CH₃CN in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8 (buffer A) and 20% CH₃CN containing 200 mM NaClO₄ in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8 (buffer B). Flow rates were 1.0 mL.min⁻¹ and 4 mL.min⁻¹ for analysis and semi-preparative purposes, respectively. MALDI-TOF mass spectra were recorded on a Voyager-DE spectrometer equipped with a N₂ laser (337 nm) (PerSeptive Biosystems, USA) or a Axima assurance spectrometer equipped with a N₂ laser (337 nm) (Shimadzu Biotech) using 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP) as a saturated solution in a mixture of acetonitrile / 0.1 M ammonium citrate solution (1:1, v/v) for the matrix. Analytical samples were mixed with the matrix in a (1:5, v/v) ratio, crystallized on a stainless steel plate and analysed. UV quantifications of RNAs were performed on a Varian Cary 300 Bio UV / Visible spectrometer by measuring absorbance at 260 nm.

Synthesis of benzyldisulfanylpyridine **3** (CAS 133616-49-6)

To a stirred solution of 2,2'-dithiodipyridine (1.33 g, 6.04 mmol, 1.50 equiv) in 1:1 MeOH / DMF (50 mL), was added dropwise a solution of benzyl mercaptan (0.50 g, 4.03 mmol, 1.00 equiv) in 8 mL of MeOH / DMF (1:1, v/v). The yellow mixture was stirred under argon atmosphere at room temperature for 30 minutes. Then the mixture was diluted with EtOAc (80 mL) and washed with saturated aqueous NaHCO₃ (3 x 40 mL) and brine (40 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography with a mixture of cyclohexane and EtOAc (80:20, v/v). The desired compound **3** was obtained as clear oil (759 mg, 3.25 mmol, 81%). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.43 (dq, *J* = 4.8 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H_{pyridyl}) ; 7.54 - 7.50 (m, 2 H, H_{pyridyl}) ; 7.32 - 7.20 (m, 5 H, H_{aro}) ; 7.09 (ddd, *J* = 6.3 Hz, *J* = 4.8 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H_{pyridyl}) ; 4.02 (s, 2 H, CH₂). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 160.0 (C_q) ; 149.3 (C_{py}) ; 136.8 (C_{py}) ; 136.5 (C_q) ; 129.3, 128.5, 127.6 (C_{arom}) ; 120.5 (C_{py}) ; 119.6 (C_{py}) ; 43.7 (CH₂). HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd for C₁₂H₁₁NS₂ [M + H]⁺ 234.0411, Found 234.0410.

Synthesis of 2'-O-AcSM-3',5'-O-TIPS cytidine 7a

To a solution of 2'-O-methylthiomethyl-3',5'-O-(tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl) cytidine 5a (3.00 g, 5.11 mmol, 1.0 equiv) in dry CH₂Cl₂ (34 mL) was added dropwise under argon a 1.0 M SO₂Cl₂ solution in CH₂Cl₂ (8.00 mL, 7.67 mmol, 1.5 equiv). The mixture was stirred for 1.5 h at room temperature. After completion of the reaction, the chloromethylether derivative 6a was obtained as brown foam after evaporation of the solvent and was directly used in the next step. 18-crown-6 (18-C-6) (1.01 g, 3.83 mmol, 0.75 equiv) was added to potassium thioacetate (1.00 g, 8.79 mmol, 1.72 equiv) solution in CH₂Cl₂ (13 mL). The solution was added dropwise to the chloromethyl ether derivative in dry CH₂Cl₂ (13 mL). After stirring at room temperature for 3 h, the mixture was evaporated and diluted in EtOAc. The solution was filtered and washed with water. The aqueous layer was then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane/EtOAc (7:3, v/v). The desired compound 7a was obtained as white foam (1.89 g, 3.07 mmol, 60%). **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 10.06 (s, 1 H, NH) ; 8.26 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, H₆) ; 7.41 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, H₅) ; 5.79 (s, 1 H, H_{1'}) ; 5.46, 5.35 (2d_{AB}, *J*_{AB} = 11.2 Hz, 2 H, OCH₂S) ; 4.25 (d, *J* = 13.6 Hz, 1 H, H_{5'}) ; 4.16 - 4.07 (m, 3 H, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}) ; 3.96 (dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1 H, H_{5''}) ; 2.36 (s, 3 H, SCOCH₃) ; 2.28 (s, 3 H, CH₃ Ac) ; 1.09 - 0.98 (m, 28 H, iPr). **¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ 194.2 (SC=O) ; 171.0 (C=O) ; 162.9 (C=O), 144.3 (C₆) ; 96.3 (C₅) ; 89.5 (C_{1'}) ; 81.9 (C_{4'}) ; 80.7 (C_{2'}) ; 69.9 (OCH₂S) ; 67.3 (C_{3'}) ; 59.3 (C_{5'}) ; 30.9 (SCOCH₃) ; 24.9 (CH₃) ; 17.4-16.8 (CH₃, iPr) ; 13.4 - 12.5 (CH, iPr). **HRMS (ESI⁺)** *m/z* calcd for C₂₆H₄₅N₃O₈Si₂S [M + H]⁺ 616.2544, Found 616.2550.

Synthesis of 2'-O-AcSM-3',5'-O-TIPS adenosine 7b

Using the same procedure as for the synthesis of 7a, starting from 5b (7.52 g, 10.70 mmol), compound 7b was obtained as a white foam (5.69 g, 7.78 mmol, 73%). Purification conditions: silica gel column chromatography with cyclohexane / EtOAc (6/4, v/v). **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 9.48 (s, 1 H, NH) ; 8.75 (s, 1 H, H₂) ; 8.26 (s, 1 H, H₈) ; 7.36 - 7.03 (m, 5 H, H_{aro}) ; 6.02 (s, 1 H, H_{1'}) ; 5.37 (s, 2 H, OCH₂S) ; 4.87 (s, 2 H, CH₂ PAC) ; 4.83 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 5.4 Hz, 1 H, H_{3'}) ; 4.54 (d, *J* = 4.8 Hz, 1 H, H_{2'}) ; 4.18 (dd, *J* = 13.2 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1 H, H_{5'}) ; 4.11 (dt, *J* = 9.2 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1 H, H_{4'}) ; 4.01 (dd, *J* = 13.2 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H_{5''}) ; 2.32 (s, 3 H, CH₃) ; 1.10 - 1.06 (m, 28 H, iPr). **¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ 194.2 (SC=O) ; 166.6 (C=O) ; 157.0 (C_q PAC) ; 152.5 (C₂) ; 150.9 (C₄) ; 148.3 (C₆) ; 141.8 (C₈) ; 129.8, 122.4, 115.0 (C_{aro}) ; 122.9 (C₅) ; 88.6 (C_{1'}) ; 81.6 (C_{4'}) ; 80.5 (C_{2'}) ; 70.2 (OCH₂S) ; 69.3 (C_{3'}) ; 68.1 (CH₂ PAC) ; 59.8 (C_{5'}) ; 30.9 (CH₃) ; 17.4-16.9 (CH₃ iPr) ; 13.4-12.6 (CH iPr). **HRMS (ESI⁺)** *m/z* calcd for C₃₃H₄₉N₅O₈Si₂S [M + H]⁺ 732.2919, Found 732.2924.

Synthesis of 2'-O-AcSM-3',5'-O-TIPS guanosine 7c

To a solution of 2'-O-methylthiomethyl-3',5'-O-(tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl) guanosine 5c (6.67 g, 9.26 mmol, 1.0 equiv) in dry CH₂Cl₂ (100 mL) was added dropwise under argon a

1.0 M SO₂Cl₂ solution in CH₂Cl₂ (11.10 mL, 11.10 mmol, 1.2 equiv) and 4-chloro-styrene (1.23 mL, 10.19 nmol, 1.1 eq). The mixture was stirred for 1 h at room temperature. After completion of the reaction, the chloromethylether derivative **6c** was obtained as brown foam after evaporation of the solvent and was directly used in the next step. 18-C-6 (1.84 g, 6.95 mmol, 0.75 equiv) was added to a CH₂Cl₂ (25 mL) potassium thioacetate solution (1.82 g, 15.93 mmol, 1.72 equiv). The solution was added dropwise to the chloromethyl ether derivative in dry CH₂Cl₂ (50 mL). After stirring at room temperature for 2 h, the mixture was evaporated and diluted in EtOAc. The solution was filtered and washed with water. The aqueous layer was then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography with CH₂Cl₂ / MeOH (99:1, v/v). The desired compound **7c** was obtained as white foam (4.52 g, 6.04 mmol, 65%). **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 11.84 (s, 1 H, NH) ; 9.60 (s, 1 H, NH) ; 8.01 (s, 1 H, H₈) ; 7.36 - 6.97 (m, 5 H, H_{aro}) ; 5.88 (s, 1 H, H_{1'}) ; 5.48, 5.39 (2d_{AB}, J_{AB} = 11.2 Hz, 1 H + 1 H, OCH₂S) ; 4.72 (s, 2 H, CH₂ PAC) ; 4.44 (dd, J = 9.2 Hz, J = 4.4 Hz, 1 H, H_{3'}) ; 4.33 (d, J = 4.4 Hz, 1 H, H_{2'}) ; 4.19 (d, J = 13.2 Hz, 1 H, H_{5'}) ; 4.11 (dt, J = 9.3 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, H_{4'}) ; 3.98 (dd, J = 13.2 Hz, J = 2.4 Hz, 1 H, H_{5''}) ; 2.26 (s, 3 H, CH₃) ; 1.09 - 0.99 (m, 28 H, iPr). **¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ 194.7 (SC=O) ; 169.8 (C=O) ; 156.5 (C_q PAC) ; 155.2 (C₆) ; 146.6 (C₄) ; 146.4 (C₈) ; 136.7 (C₂) ; 129.9, 122.9, 114.9 (C_{aro}) ; 122.2 (C₅) ; 87.8 (C_{1'}) ; 81.7 (C_{4'}) ; 80.9 (C_{2'}) ; 70.2 (OCH₂O) ; 68.6 (C_{3'}) ; 67.0 (CH₂ PAC) ; 59.6 (C_{5'}) ; 30.8 (CH₃) ; 17.4 - 16.8 (CH₃iPr) ; 13.4-12.5 (CHiPr). **HRMS (ESI⁺)** m/z calcd for C₃₃H₄₉N₅O₉Si₂S [M + H]⁺ 748.2868, Found 748.2869.

Synthesis of 2'-O-AcSM cytidine **8a**

To a solution of **7a** (3.58 g, 5.82 mmol, 1.0 equiv) in anhydrous THF (83 mL) was added Et₃N-3HF solution (1.90 mL, 11.63 mmol, 2.0 equiv). After stirring for 2 h at room temperature, the reaction mixture was treated with triethylammoniumacetate buffer (2 M, pH 7). The solvent was concentrated under reduced pressure. The crude material was coevaporated with water and ACN. The residue was purified by silica gel column chromatography with a step gradient of CH₂Cl₂ and MeOH (0 - 5%). The desired compound **8a** was obtained as white foam (1.61 g, 4.31 mmol, 74%). **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)** δ 10.88 (s, 1 H, NH) ; 8.39 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, H₆) ; 7.19 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, H₅) ; 5.86 (d, J = 2.8 Hz, 1 H, H_{1'}) ; 5.25 (s, 2 H, OCH₂S) ; 5.19 (m, 1 H, OH) ; 4.09 (dd, J = 6.4 Hz, J = 5.2 Hz, 1 H, H_{3'}) ; 4.01 (dd, J = 5.2 Hz, J = 3.2 Hz, 1 H, H_{2'}) ; 3.88 (m, 1 H, H_{4'}) ; 3.73 (dd, J = 12.4 Hz, J = 2.8 Hz, 1 H, H_{5'}) ; 3.57 (dd, J = 12.4 Hz, J = 3.2 Hz, 1 H, H_{5''}) ; 3.38 (d, J = 9.2 Hz, 1 H, OH) ; 2.35 (s, 3 H, SCOCH₃) ; 2.10 (s, 3 H, CH₃ Ac). **¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆)** δ 194.4 (SC=O) ; 171.0 (C=O) ; 162.4 (C=O), 154.6 (C₆) ; 145.2 (C_q) ; 95.4 (C₅) ; 87.9 (C_{1'}) ; 84.4 (C_{4'}) ; 81.1 (C_{2'}) ; 69.1 (OCH₂S) ; 67.4 (C_{3'}) ; 59.5 (C_{5'}) ; 30.8 (SCOCH₃) ; 24.3 (CH₃). **HRMS (ESI⁺)** m/z calcd for C₁₄H₁₉N₃O₇S [M + H]⁺ 374.1022, Found 374.1021.

Synthesis of 2'-O-AcSM adenosine **8b**

Using the same procedure as for synthesis of **8a**, starting from **7b** (5.59 g, 7.65 mmol), compound **8b** was obtained as white foam (3.31 g, 6.77 mmol, 88%). Purification conditions:

silica gel column chromatography with a step gradient of CH₂Cl₂ and MeOH (0 - 5%). **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 9.63 (s, 1 H, NH) ; 8.78 (s, 1 H, H₂) ; 8.10 (s, 1 H, H₈) ; 7.36 - 7.03 (m, 5 H, H_{aro}) ; 5.95 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, H_{1'}) ; 4.98, 4.83 (2d_{AB}, *J*_{AB} = 11.2 Hz, 2 H, OCH₂S) ; 4.88 (s, 2 H, CH₂ PAC) ; 4.85 (dd, *J* = 4.8 Hz, *J* = 2.8 Hz, 1 H, H_{2'}) ; 4.64 (d, *J* = 4.8 Hz, 1 H, H_{3'}) ; 4.37 (s, 1 H, H_{4'}) ; 3.96 (dd, *J* = 12.8 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1 H, H_{5'}) ; 3.77 (dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1 H, H_{5''}) ; 2.22 (s, 3 H, CH₃). **¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ 194.4 (SC=O) ; 166.8 (C=O) ; 156.9 (Cq PAC) ; 152.1 (C₂) ; 150.6 (C₄) ; 149.1 (C₆) ; 143.6 (C₈) ; 129.8, 122.5, 114.9 (C_{aro}) ; 124.0 (C₅) ; 89.1 (C_{1'}) ; 88.0 (C_{4'}) ; 80.7 (C_{2'}) ; 70.8 (C_{3'}) ; 69.4 (OCH₂S) ; 68.1 (CH₂ PAC) ; 63.0 (C_{5'}) ; 30.7 (CH₃). **HRMS (ESI⁺)** *m/z* calcd for C₂₁H₂₃N₅O₇S [M + H]⁺ 490.1396, Found 490.1396.

Synthesis of 2'-O-AcSM guanosine **8c**

Using the same procedure as for synthesis of **8a**, starting from **7c** (4.52 g, 6.04 mmol), compound **8c** was obtained as white foam (2.12 g, 4.20 mmol, 70%). Purification conditions: silica gel column chromatography with a step gradient of CH₂Cl₂ and MeOH (0 - 5%). **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)** δ 11.82 (s, 1 H, NH) ; 9.25 (s, 1 H, NH) ; 7.88 (s, 1 H, H₈) ; 7.43 - 6.80 (m, 19 H, H_{aro}) ; 6.99 (d, *J* = 4.8 Hz, 1 H, H_{1'}) ; 5.21, 5.16 (2d_{AB}, *J*_{AB} = 11.2 Hz, 1 H + 1 H, OCH₂S) ; 4.64 - 4.62 (m, 2 H + 1 H, CH₂ PAC + H_{2'}) ; 4.47 (q, *J* = 4.8 Hz, 1 H, H_{3'}) ; 4.22 (q, *J* = 4.0 Hz, 1 H, H_{4'}) ; 3.77 (s, 6 H, OCH₃) ; 3.44 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 2.8 Hz, 1 H, H_{5'}) ; 3.37 (dd, *J* = 10.8 Hz, *J* = 4.0 Hz, 1 H, H_{5''}) ; 2.27 (s, 3 H, CH₃). **¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆)** δ 194.4 (SC=O) ; 169.6 (C=O) ; 158.6, 144.4, 137.4, 135.5, 135.4 (Cq DMTr) ; 156.4 (Cq PAC) ; 155.3 (C₆) ; 147.8 (C₄) ; 146.3 (C₈) ; 137.8 (C₂) ; 130.1, 130.0, 129.9, 129.0, 128.2, 128.1, 127.9, 127.0, 125.3, 122.9, 114.8, 113.2 (C_{aro}) ; 122.1 (C₅) ; 86.7 (C_{1'}) ; 85.8 (C_{4'}) ; 84.2 (OCq, DMTr) ; 81.2 (C_{2'}) ; 70.0 (OCH₂S) ; 69.8 (C_{3'}) ; 66.9 (CH₂ PAC) ; 63.3 (C_{5'}) ; 55.2 (OCH₃, DMTr) ; 30.9 (CH₃). **HRMS (ESI⁺)** *m/z* calcd for C₄₂H₄₁N₅O₁₀S [M + H]⁺ 808.2652, Found 808.2652.

Synthesis of 2'-O-AcSM-5'-O-DMTr cytidine **9a**

A solution of **8a** (1.61 g, 4.31 mmol, 1.0 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (22 mL) was treated under argon with DIEA (1.21 mL, 6.89 mmol, 1.6 equiv) and dimethoxytrityl chloride (2.48 g, 7.32 mmol, 1.7 equiv) was added in small portions over 15 min. The mixture was stirred for 1.5h at room temperature. A saturated aqueous NaHCO₃ solution was added. The aqueous layer was then extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with water then brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography with a step gradient of CH₂Cl₂ and MeOH (0 -2%) containing 1% pyridine. The desired compound **9a** was obtained as yellow foam (2.51 g, 3.72 mmol, 86%). **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 9.62 (s, 1 H, NH) ; 8.46 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, H₆) ; 7.42 - 7.16 (m, 9 H, H_{aro} DMTr) ; 7.13 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, H₅) ; 6.88 - 6.84 (m, 4 H, H_{aro} DMTr) ; 5.96 (s, 1 H, H_{1'}) ; 5.50, 5.37 (2d_{AB}, *J*_{AB} = 11.2 Hz, 1 H + 1 H, OCH₂S) ; 4.44 (m, 1 H, H_{3'}) ; 4.15 (d, *J* = 5.2 Hz, 1 H, H_{2'}) ; 4.04 (dt, *J* = 9.2 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H_{4'}) ; 3.81 (d, *J* = 1.6 Hz, 6 H, 2*OCH₃) ; 3.54 (qd, *J* = 11.2 Hz, *J* = 2.0 Hz, 2 H, H_{5'} + H_{5''}) ; 2.38 (s, 3 H, SCOCH₃) ; 2.26 (s, 3 H, CH₃ Ac). **¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ 194.9 (SC=O) ; 170.4 (C=O) ; 162.9 (C=O) ; 158.7, 155.0, 144.3, 135.5, 135.2 (Cq, C_{aro}) ; 144.6 (C₆) ; 130.1, 129.0, 128.2, 128.1, 128.0, 127.1, 125.3, 113.3

(CH, C_{aro}); 96.7 (C₅); 88.9 (C_{1'}); 87.0 (OCq, DMTr); 83.1 (C_{4'}); 81.3 (C_{2'}); 69.7 (OCH₂S); 67.6 (C_{3'}); 60.7 (C_{5'}); 55.2 (OCH₃, DMTr); 31.0 (SCOCH₃); 24.9 (CH₃ Ac). **HRMS (ESI⁺)** m/z calcd for C₃₅H₃₇N₃O₉S [M + H]⁺ 676.2329, Found 676.2335.

Synthesis of 2'-O-AcSM-5'-O-DMTr adenosine **9b**

Using the same procedure as for synthesis of **9a**, starting from **8b** (3.10 g, 6.33 mmol), compound **9b** was obtained as white foam (3.67 g, 4.63 mmol, 73%). Purification conditions: silica gel column chromatography with a step gradient of CH₂Cl₂ and MeOH (0 - 2%) containing 1% pyridine. **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 9.48 (s, 1 H, NH); 8.72 (s, 1 H, H₂); 8.24 (s, 1 H, H₈); 7.44 - 6.81 (m, 18 H, H_{aro}); 6.19 (d, *J* = 4.8 Hz, 1 H, H_{1'}); 5.18 (s, 2 H, OCH₂S); 4.87 (s, 2 H, CH₂ PAC); 4.85 (t, *J* = 4.8 Hz, 1 H, H_{2'}); 4.59 (q, *J* = 5.2 Hz, 1 H, H_{3'}); 4.25 (q, *J* = 4.0 Hz, 1 H, H_{4'}); 3.78, 3.77 (s + s, 3 H + 3 H, 2*OCH₃); 3.52 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 3.2 Hz, 1 H, H_{5'}); 3.40 (dd, *J* = 10.8 Hz, *J* = 4.0 Hz, 1 H, H_{5''}); 2.28 (s, 3 H, CH₃). **¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ 194.4 (SC=O); 166.6 (C=O); 158.5, 144.5, 137.8, 135.6, 135.5 (Cq DMTr); 157.0 (Cq PAC); 152.5 (C₂); 151.5 (C₄); 148.3 (C₆); 142.2 (C₈); 130.0, 129.8, 129.0, 128.2, 128.1, 127.9, 126.9, 125.2, 122.4, 114.9, 113.2 (C_{aro}); 123.1 (C₅); 86.9 (C_{1'}); 86.6 (OCq, DMTr); 84.2 (C_{4'}); 80.7 (C_{2'}); 70.0 (OCH₂S); 69.7 (C_{3'}); 68.1 (CH₂ PAC); 62.9 (C_{5'}); 55.2 (OCH₃, DMTr); 30.8 (CH₃). **HRMS (ESI⁺)** m/z calcd for C₄₂H₄₁N₅O₉S [M + H]⁺ 792.2703, Found 792.2711.

Synthesis of 2'-O-AcSM-5'-O-DMTr guanosine **9c**

Using the same procedure as for synthesis of **9a**, starting from **8c** (0.85 g, 1.69 mmol), compound **9c** was obtained as yellow foam (1.21 g, 1.50 mmol, 87%). Purification conditions: silica gel column chromatography with a step gradient of CH₂Cl₂ and MeOH (0 - 1%) containing 1% pyridine. **¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)** δ 11.82 (s, 1 H, NH); 9.25 (s, 1 H, NH); 7.88 (s, 1 H, H₈); 7.43 - 6.80 (m, 19 H, H_{aro}); 6.99 (d, *J* = 4.8 Hz, 1 H, H_{1'}); 5.21, 5.16 (2d_{AB}, *J*_{AB} = 11.2 Hz, 1 H + 1 H, OCH₂S); 4.64 - 4.62 (m, 2 H + 1 H, CH₂ PAC + H_{2'}); 4.47 (q, *J* = 4.8 Hz, 1 H, H_{3'}); 4.22 (q, *J* = 4.0 Hz, 1 H, H_{4'}); 3.77 (s, 6 H, OCH₃); 3.44 (dd, *J* = 10.4 Hz, *J* = 2.8 Hz, 1 H, H_{5'}); 3.37 (dd, *J* = 10.8 Hz, *J* = 4.0 Hz, 1 H, H_{5''}); 2.27 (s, 3 H, CH₃). **¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)** δ 194.4 (SC=O); 169.6 (C=O); 158.6, 144.4, 137.4, 135.5, 135.4 (Cq DMTr); 156.4 (Cq PAC); 155.3 (C₆); 147.8 (C₄); 146.3 (C₈); 137.8 (C₂); 130.1, 130.0, 129.9, 129.0, 128.2, 128.1, 127.9, 127.0, 125.3, 122.9, 114.8, 113.2 (C_{aro}); 122.1 (C₅); 86.7 (C_{1'}); 85.8 (C_{4'}); 84.2 (OCq, DMTr); 81.2 (C_{2'}); 70.0 (OCH₂S); 69.8 (C_{3'}); 66.9 (CH₂ PAC); 63.3 (C_{5'}); 55.2 (OCH₃, DMTr); 30.9 (CH₃). **HRMS (ESI⁺)** m/z calcd for C₄₂H₄₁N₅O₁₀S [M + H]⁺ 808.2652, Found 808.2652.

Synthesis of 2'-O-AcSM-3'-O-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite)-5'-O-DMTr-cytidine **10a**

To a solution of **9a** (1.83 g, 2.71 mmol, 1.0 equiv) in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL) previously passed through an alumina column was added dropwise a mixture of *N,N*-diisopropylethylamine (0.94 mL, 5.42 mmol, 2.0 equiv) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (10.03 mL, 4.61 mmol, 1.7 equiv) in CH₂Cl₂ (4 mL). The mixture was stirred for 2h at room temperature under argon. After reaction completion,

EtOAc previously washed with a saturated aqueous NaHCO₃ solution was added and the reaction mixture was poured into saturated NaCl/NaHCO₃ solution (1:1, v/v). The aqueous layer was extracted with EtOAc and organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography with an isocratic elution of EtOAc / Cyclohexane (9:1, v/v) containing 1% pyridine. The desired phosphoramidite **10a** was obtained as white foam (1.62 g, 1.85 mmol, 68%) as two diastereoisomers. ³¹P-NMR (121 MHz, CD₃CN): δ 150.1, 148.7; HRMS (ESI⁺) m/z calcd for C₄₂H₅₄N₅O₁₀PS [M + H]⁺ 876.3407, Found 876.3406.

Synthesis of 2'-O-AcSM-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidite)-5'-O-DMTr-adenosine **10b**

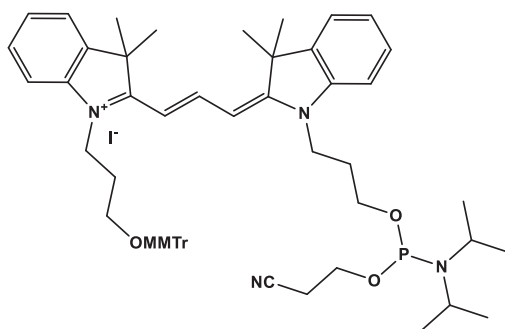
Using the same procedure as for synthesis of **10a**, starting from **9b** (3.08 g, 3.88 mmol), compound **10b** was obtained as white foam (3.20 g, 3.23 mmol, 83%) as two diastereoisomers. Purification conditions: silica gel column chromatography with an isocratic elution of CH₂Cl₂/EtOAc (7:3, v/v) containing 1% pyridine. ³¹P-NMR (121 MHz, CD₃CN): δ 149.9, 149.8; HRMS (ESI⁺) m/z calcd for C₅₁H₅₈N₇O₁₀PS [M + H]⁺ 992.3791, Found 992.3782.

Synthesis of 2'-O-AcSM-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidite)-5'-O-DMTr-guanosine **10c**

Using the same procedure as for synthesis of **10a**, starting from **9c** (0.86 g, 1.07 mmol), compound **10c** was obtained as white foam (0.90 g, 0.89 mmol, 84%) as two diastereoisomers. Purification conditions: silica gel column chromatography with an isocratic elution of CH₂Cl₂/EtOAc (1:1, v/v). ³¹P-NMR (121 MHz, CD₃CN): δ 150.1, 149.8; HRMS (ESI⁺) m/z calcd for C₅₁H₅₉N₇O₁₁PS [M + H]⁺ 1008.3730, Found 1008.3731.

Oligonucleotide synthesis and purification

RNA oligonucleotides **11** - **18** were synthesized using an ABI model 394 DNA / RNA synthesizer on a 1 μmol scale using commercially available 2'-O-PivOM phosphoramidites (Chemgenes) or 2'-O-AcSM phosphoramidites **3** and **10a-c** and a long chain alkylamine (LCAA) controlled-pore glass (CPG) as solid support. Cy3-5' labeled ON **19** and **20** were synthesized by using Cy3-phosphoramidite (GE Healthcare).



Structure of Cy3-phosphoramidite

Oligonucleotides were assembled in a TWIST™ synthesis columns (Glen Research). Phosphoramidites were vacuum dried prior to their dissolution in extra dry acetonitrile (Biosolve) at 0.1 M concentration. Coupling for 180 s was performed with 5-benzylmercaptotetrazole (BMT, 0.3 M) as the activator. The oxidizing solution was 0.1 M iodine in THF / pyridine / H₂O (78:20:2; v/v/v) (Link Technologies). The capping step was performed for 160 s with a mixture of 5% phenoxyacetic anhydride (Pac₂O) in THF and 10% *N*-méthylimidazole in THF (Link Technologies). Detritylation was performed with 3% TCA in CH₂Cl₂. After RNA assembly completion, the column was removed from the synthesizer and dried under a stream of argon.

After RNA elongation, the solid support was treated with 1.5 mL of a 0.4 to 0.7 M solution of benzyldisulfanylpiperidine **3** (100 equiv. by modification) in 2.5 M butylamine (0.4 mL) and anhydrous THF (1.1 mL) using two glass syringes filled with 4 Å molecular sieves (5 beads each). The solution was pushed back and forth through the synthesis column for 15 min. After removal of the solution, the solid support was washed with anhydrous THF followed by a 1 min flush with argon. The solid support was treated with a 30% aqueous ammonia solution for 3 h at 30°C. The deprotection solution was evaporated in the presence of isopropylamine (13% of total volume) under reduced pressure. The residue was dissolved in 1.5 mL of water and transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized.

The crude 2'-*O*-BnSSM oligonucleotides were purified by IEX-HPLC. The fractions containing pure ON were pooled in a 100 mL round-bottomed flask and were concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in 100 mL TEAAc buffer, pH 7 and the solution was desalted using a C18 cartridge (Sep-Pak®, Waters) equilibrated with a 100 mM TEAAc buffer solution. The desired compound was eluted with a 12.5 mM TEAAc / CH₃CN (1:1, v/v) solution in a 100 mL round-bottomed flask and was lyophilized. The residue was dissolved in 1.5 mL water (divided in 3 portions 0.8 mL, 0.4 mL and 0.3 mL for flask rinse), transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized. Purified RNAs were characterized by MALDI-TOF spectrometry and were quantified by UV measurement. Lyophilized RNAs were stored at -20 °C for several months without any degradation.

HPLC analyses of modified oligonucleotides

Strand	N°	Sequences 5' → 3' ^a	Schematic representation ^b	Gradient (% of B buffer) ^c	Temperature ^d	Retention time (min)
Sense siEF-4S	<u>11</u>	5' G _R C _A R _R G _C R _A G _R AA CCC UUC UUA UGA 3'		0 to 75 % in 20 min	30 °C	17,3
	<u>12</u>	5' GCA GCA GAA CCC UUC _R UU _R A U _R GA 3'		0 to 75 % in 20 min	30 °C	16,2
	<u>13</u>	5' G _R C _A R _R G _C R _A GAA CCC UUC _R UU _R A U _R GA 3'		10 to 90 % in 20 min	30 °C	15,0
	<u>14</u>	5' G _R CA G _C R _A G _A R _A C _C R _C UU _R C UU _R A U _R GA 3'		30 to 100 % in 20 min	30 °C	17,1
Antisense siEF-4AS	<u>15</u>	5' A _R UA _R A _G R _A A _R GG GUU CUG CUG CCC 3'		40 to 100 % in 20 min	75 °C	18,7
	<u>16</u>	5' AUA AGA AGG GUU CUG _R CU _R G C _R CC 3'		30 to 100 % in 20 min	75 °C	19,9
	<u>17</u>	5' A _R UA _R A _G R _A AGG GUU CUG _R CU _R G C _R CC 3'		40 to 100 % in 20 min	75 °C	19,9
	<u>18</u>	5' A _R UA A _R GA A _R GG G _R UU C _R UG C _R UG C _R CC 3'		40 to 100 % in 20 min	60 °C	16,8

^a C_R, A_R, G_R, U_R = 2'-O-BnSSM ribonucleotides; G, C, A, U = 2'-OH ribonucleotides

^b ● = modification 2'-O-BnSSM

^c IEX-HPLC analysis : Dionex DNAPac Pa100, 4x250 mm, buffer A : 20% CH₃CN in 25 mM Tris HCl pH 8, Buffer B : 20% CH₃CN containing 200 mM NaClO₄ in 25 mM Tris HCl pH 8, flow rate : 1 mL / min, detection at 260 nm

^d Temperature of the column during analysis

Thermal denaturation studies

T_m experiments were performed using a CARY 300 UV Spectrophotometer (Varian Inc.) equipped with a Peltier temperature controller and thermal analysis software. The samples were prepared by mixing ON solutions of RNA sense and antisense strands together to give 1.5 μM final concentration in 1 mL of buffer (10 mM sodium cacodylate, 100 mM NaCl, pH 7) in a 1 cm path length quartz cell. A heating-cooling-heating cycle in the 0 – 90 °C temperature range with a gradient of 0.5 °C.min⁻¹ was applied. *T_m* values were determined from the maxima of the first derivative plots of absorbance versus temperature. The *T_m* values from two independent experiments were accurate within ± 0.5 °C. The solutions were stored after analysis in 2 mL Eppendorf-vials at - 80 °C.

CD Spectroscopy studies

CD spectra were recorded on a Jasco J-815 spectropolarimeter. The samples were prepared by mixing ON solutions of RNA sense and antisense strands together to give 1.5 μM final concentration in 1 mL of buffer (10 mM sodium cacodylate, 100 mM NaCl, pH 7) in a 1 cm path length quartz cell. Measurements were performed at 1 °C with the wavelength range set to 340-200 nm with a scanning speed of 100 nm.min⁻¹. Raw data were acquired over 2 scans.

Serum Stability

For annealing complementary RNA strands, equimolar amounts of sense and antisense strand were incubated in H₂O milliQ for 5 min at 90 °C followed by slow cooling to room temperature. siRNAs (C = 100 μM, V = 4 μL) were incubated with a Phosphate Buffered Saline solution (PBS) 10X (2.4 μL), H₂O milliQ (15.2 μL) and a human serum AB type solution (Sigma) or a foetal bovine serum solution (FBS) (Sigma) (2.4 μL) at 37 °C. After 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min and 480 min, 3 μL were withdrawn and immediately frozen in liquid

nitrogen and stored at -80 °C until analysis. Each sample was then analysed by gel electrophoresis (15% Polyacrylamide) 20 W, 1.5 h h 30 at 4 °C. The gels were stained with GelRed 3X (VWR) in a 0.1 M NaCl solution for 1 h and revealed with UV transilluminator. Band analysis was performed using ImageJ Software (Broken Symmetry Software V:1.4.3.67). Half-life lives were determined by the hypothesis of a 1 first-order kinetic, the calculation were performed on Microsoft Office Excel with an exponential trend line given by $y(t)=Ae^{-kt}$ ($0.90 \leq R^2 \leq 1.00$).

Glutathione treatment

siRNA duplexes were annealed as previously described. 2 nmol of duplexes (10 µL) were mixed with 40 µL of a glutathione-HEPES buffer (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05 mM EDTA, 7.5 mM HEPES, 10 mM glutathione, pH 8) and incubated at 37 °C. After 1 min, 60 min, 120 min, 240 min, 480 min and 1440 min, aliquots (10 µL) were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Samples were diluted with water and analysed by IEX-HPLC and MALDI-TOF MS.

Cellular uptake (Epi-fluorescence microscopy)

For cell delivery measurement, 5×10^4 A673 cells were seeded on day before treatment in DMEM medium (Gibco, Life Technologies) containing 10% foetal calf serum (Gibco, Life Technologies) and 1% Penicillin, streptomycin solution (Gibco, Life Technologies) in 12 wells-plate containing a glass cover slide rinsed once in ethanol bath and once in sterile water and then incubated at 37 °C, with 5% CO₂ and 95% hygrometry. Medium was discarded and replaced by 500 µL of 500 nM Cy3-siRNA in DMEM medium containing 10% foetal calf serum and 1% penicillin, streptomycin solution for 3 h, 24 h or 48 h at 37 °C, 5% CO₂ and 95% hygrometry. The medium was discarded and the cells are gently washed with PBS and incubated in dark at room temperature with 4% formalin in PBS buffer. After three washes with PBS, cells are mounted on slide with DAPI fluoromount G (SouthernBiotech) before being observed with an epi-fluorescence microscope (Observer; Zeiss) to confirm the presence of intracytoplasmic siRNA. Untreated cells present only a blue fluorescence due to nucleus coloration.

Inhibition of EWS-Fli1 measurement by RT-qPCR

One day before treatment, 3×10^5 human Ewing sarcoma cells A673 were seeded in 12 wells-plate in DMEM medium (Gibco, Life Technologies) containing 10% fetal calf serum (Gibco, Life Technologies) and 1% Penicillin, streptomycin solution (Gibco, Life Technologies) and then incubated at 37 °C, with 5% CO₂ and 95% hygrometry. Then medium was discarded and replaced by 500 µL of siRNA (50 nM with Lipofectamine® or 500 nM without Lipofectamine®) in DMEM medium containing 10% fetal calf serum and 1% penicillin, streptomycin solution for 24 h at 37°C, 5% CO₂ and 95% hygrometry. After the medium was discarded, cells were lysed by 400 µL of Trizol solution (Invitrogen) and collected in Eppendorf tubes. Total RNA were extracted by adding 60 µL of chlorophorm:isoamyl alcool (49:1). After centrifugation 13000

rpm for 15 min at 10 °C, 150 µL of the aqueous phase was precipitated by isopropanol (150 µL) for 15 min at room temperature followed by centrifugation for 15 min at 13000 rpm. The pellets were washed twice with 70% ethanol solution and dried. The pellets were solubilized with water (10 µL) containing 0.5 U / µL of RNasin (Promega) and RNA were quantified with a nanodrop (Thermo). The cDNA was prepared by heating 1.5 µg of RNA in 12.5 µL of water at 75 °C for 5 min and 2 µL of 50 µg/mL random primer (Promega). Then 4 µL of 5x M-MLV buffer (Promega), 0.5 µL dNTP 20 mM (Promega), 0.5 µL RNasin 40 U / µL (Promega) and 0.5 µL M-MLV RT 200U / µL (Promega) were added and incubation was performed for 15 min at 25 °C followed by 1 h at 42°C. qPCR was performed on 5 µL of 1/20 diluted cDNA, 0.4 µL of each one primer 10 mM, 4.2 µL H₂O and 10 µL of 2X master mix Kapa syber fast (KAPABiosystems). PCR was performed for 40 cycles in fast mode on StepOne plus (Applied Biosystems). EWS-Fli1 gene was amplified with EWS-forward primer: 5'-AGC AGT TAC TCT CAG CAG AAC ACC-3' and Fli1 reverse: 5'-CCA GGA TCT GAT ACG GAT CTG GCC-3'. As a control, we used GAPDH gene with forward primer. The comparative Ct method was used to normalize the target Ct by the GAPDH control gene Ct.

Inhibition of cell growth

One day before treatment, 10⁴ human Ewing sarcoma cells A673 were seeded in 96 wells-plate in DMEM medium (Gibco, Life Technologies) containing 10% foetal bovine serum (Gibco, Life Technologies) and 1% penicillin, streptomycin solution (Gibco, Life Technologies) and then incubated at 37°C, with 5% CO₂ and 95% hygrometry. For treatment, the medium was removed and replaced by 100 µL of same medium containing 500 nM of siRNAs to be tested. Each dose was repeated 6 times. The cells were incubated for 24 h before performing a MTT test as following. We added 10 µL of 5 mg / mL MTT (Sigma) in PBS buffer for 1 h at 37 °C, 5% CO₂ and 95% hygrometry. The cells are lysed and formazan was solubilized by 100 µL of 10% SDS and 10 mM HCl solution overnight. Produced formazan was measured with a plate reader at 570 nm (EL 808, BioTek). Results are expressed as the percentage of untreated cells.

Chapitre II : Co-délivrance de siARNs et de
doxorubicine conjugués *via* un lien auto-immolable
contenant des ponts disulfures

Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié la synthèse de prodrogues de siARNs modifiés par des groupements BnSSM. Ces ARNs ont permis d'inhiber l'expression d'une protéine responsable d'un cancer, le sarcome d'Ewing. Une amélioration de la pénétration cellulaire et une inhibition de 50% de l'expression de la protéine ciblée a été mesurée. Ce résultat démontre néanmoins qu'une marge d'amélioration existe pour renforcer l'activité biologique.

La complexité des processus cancéreux et les phénomènes de résistances aux traitements ont incité les laboratoires à développer des thérapies combinées plus efficaces. En effet, les traitements uniques génèrent souvent des résultats limités.¹⁴⁴ Une attention particulière a donc été portée à la co-délivrance de siARNs et de drogues anticancéreuses pour développer des effets synergiques au niveau cellulaire.¹⁴⁵ Une même chaîne enzymatique pathologique peut par exemple être ciblée à différents niveaux, pour renforcer l'efficacité. Cette synergie permet par ailleurs d'utiliser des quantités plus faibles de drogues anticancéreuses. Elles sont connues pour être toxiques, avec de forts effets secondaires. Ces actions simultanées permettent de réduire les doses, et donc de réduire les risques.

Nous avons donc cherché à conjuguer un siARN à une drogue anticancéreuse, la doxorubicine, par un lien covalent. L'objectif est de cumuler les avantages des deux composés : solubiliser la drogue grâce à l'hydrophilie de l'oligonucléotide et faciliter la pénétration cellulaire de l'oligonucléotide grâce à lipophilie de la drogue. Notre approche consiste à conjuguer la position 2' de l'ARN et la doxorubicine par des liens auto-immolables contenant des ponts disulfures, pour libérer ensuite les deux composés natifs dans le milieu réducteur de la cellule.

Dans un premier temps, nous décrivons les caractéristiques de la doxorubicine et les différents systèmes de co-délivrance utilisés, puis nous nous intéresserons à l'intérêt des liens auto-immolables. Nous présenterons ensuite notre stratégie de couplage sur les positions 2' des nucléosides 2'-O-AcSM, ainsi que la synthèse des précurseurs des liens auto-immolables et de la doxorubicine modifiée. Nous verrons enfin les conditions de synthèse des oligonucléotides conjugués à la doxorubicine, et l'évaluation de leurs propriétés biophysiques et biochimiques.

1. Présentation des systèmes de co-délivrance de la doxorubicine et de siARNs

1.1. Caractéristiques de la doxorubicine

La doxorubicine (**Figure 28**), brevetée en 1980, fait partie de la classe des anthracyclines, une famille de médicaments anticancéreux issus de composés naturels. Il s'agit de l'une des molécules les plus efficaces actuellement. Elle possède un squelette de type aglyconique, composé de trois cycles aromatiques et d'un quatrième substitué par une chaîne portant une fonction carbonyle et deux hydroxyles, et un sucre aminé, la daunosamine, lié à ce cycle par une liaison glycosidique. Sa structure aromatique lui confère des propriétés fluorescentes ($\lambda_{\text{excitation}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 585 \text{ nm}$), utiles pour son suivi par microscopie lors d'études biologiques malgré un rendement quantique inférieur à 10 % en milieu aqueux tamponné.¹⁴⁶

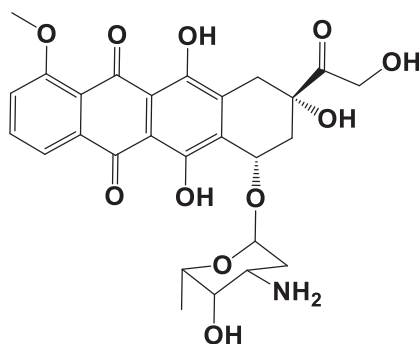


Figure 28 : Structure de la doxorubicine

Elle est encore indispensable dans le traitement des leucémies, des lymphomes ou des cancers du sein.¹⁴⁷ Néanmoins, au même titre qu'un grand nombre de molécules du même type, elle présente une forte toxicité pour les cellules saines.¹⁴⁸ En particulier, des doses élevées se sont avérées dangereuses pour certains organes (cerveau, foie, reins), et en particulier le cœur¹⁴⁹, aboutissant à la dégradation de l'état de santé des patients. Le développement de systèmes favorisant une délivrance ciblée est donc nécessaire.

Son activité provient de son intercalation au sein de la double hélice d'ADN au niveau des paires de bases G-C (**Schéma 35**).¹⁵⁰ La doxorubicine possède une affinité particulière pour les guanines, en raison de sa capacité à former plusieurs liaisons hydrogènes. Le stacking joue également un rôle, les interactions avec la doxorubicine perturbant l'empilement classique des bases.¹⁵¹ De plus, l'intercalation est renforcée par la formation d'un lien covalent, induit par le formaldéhyde cellulaire.¹⁵² Ce dernier est naturellement présent dans les cellules, produit à partir des lipides par des mécanismes radicalaires catalysés par le fer par exemple.¹⁵³ Le formaldéhyde réagit avec l'amine de la daunosamine de la doxorubicine, pour former une imine, réagissant ensuite avec l'amine exocyclique de la guanine pour créer un

lien aminal. Ce lien covalent est favorisé dans les cellules cancéreuses, en raison du stress oxydatif plus intense, ce qui est donc intéressant pour le ciblage des tumeurs. L'intercalation bloque l'activité des enzymes impliquées dans la réplication et la transcription, en particulier la topoisomérase II.¹⁵⁴ Cette enzyme contrôle la structure topologique de l'ADN par des coupures et des ligations successives des liens phosphodiesters. La doxorubicine perturbe le complexe enzymatique, empêchant la ligation. Cette action rompt les liens internucléosidiques, déclenchant les processus apoptotiques. La doxorubicine agit également au niveau de l'ADN mitochondrial, et des études montrent une activité potentielle comme initiateur de radicaux engendrant du stress oxydatif.¹⁵⁵

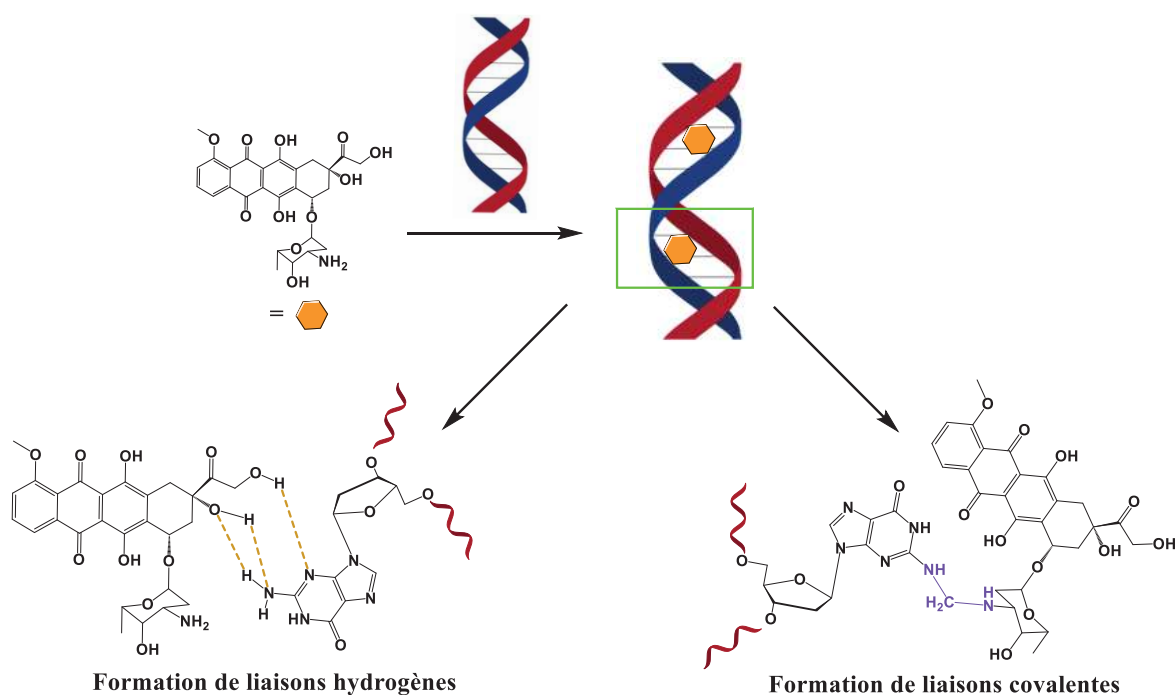


Schéma 35 : Mécanismes d'intercalation de la doxorubicine dans la double hélice d'ADN

A l'inverse, le comportement de la doxorubicine vis-à-vis des ARNs est différent. L'étude des interactions avec des ARNt a mis en évidence des liaisons hydrogènes, principalement avec les guanines, après la fixation de la doxorubicine dans le petit et le grand sillon de l'hélice.¹⁵⁶ Néanmoins, aucune modification de la structure globale de l'hélice et aucune intercalation de la doxorubicine n'ont été détectées par dichroïsme circulaire, contrairement aux observations réalisées sur l'ADN.

1.2. Vectorisation de la doxorubicine

Différentes méthodes de vectorisation de la doxorubicine ont été décrites.^{9a, 157} Tout d'abord, des approches prodrogues ont permis d'améliorer ses propriétés thérapeutiques, en particulier par l'introduction de groupements sur la fonction amine. Des sucres ou des peptides ont notamment été introduits, libérant la doxorubicine après coupure par des enzymes cellulaires (peptidase, glucuronidase, carboxyestérases).¹⁵⁸ Des prodrogues

nitroarylméthylcarbamates de la doxorubicine ont aussi été synthétisées à partir de l'amine de la daunosamine (**Figure 29**), permettant la libération de la molécule *via* l'activité nitroréductase cellulaire activant la prodrogue.¹⁵⁹

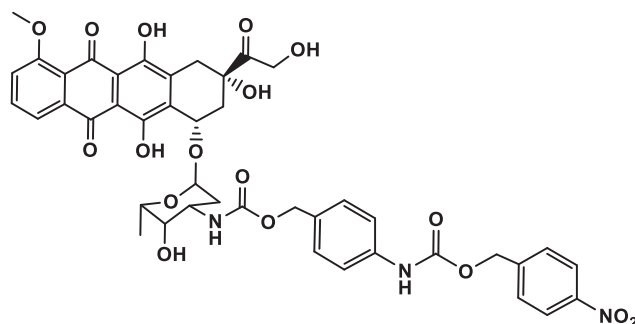


Figure 29 : Structure des prodrogues nitroarylméthylcarbamates de la doxorubicine

Des doxorubicines conjuguées à des polypeptides hydrophiles par des fonctions hydrazones se sont également avérées très efficaces (**Schéma 36**). Ces structures évoluent spontanément vers la formation de micelles, composées d'un cœur hydrophobe contenant les doxorubicines entourées par les polypeptides stables en milieu aqueux. Les liens hydrazones sont ensuite coupés à pH acide dans les lysosomes, libérant les molécules dans les cellules.¹⁶⁰

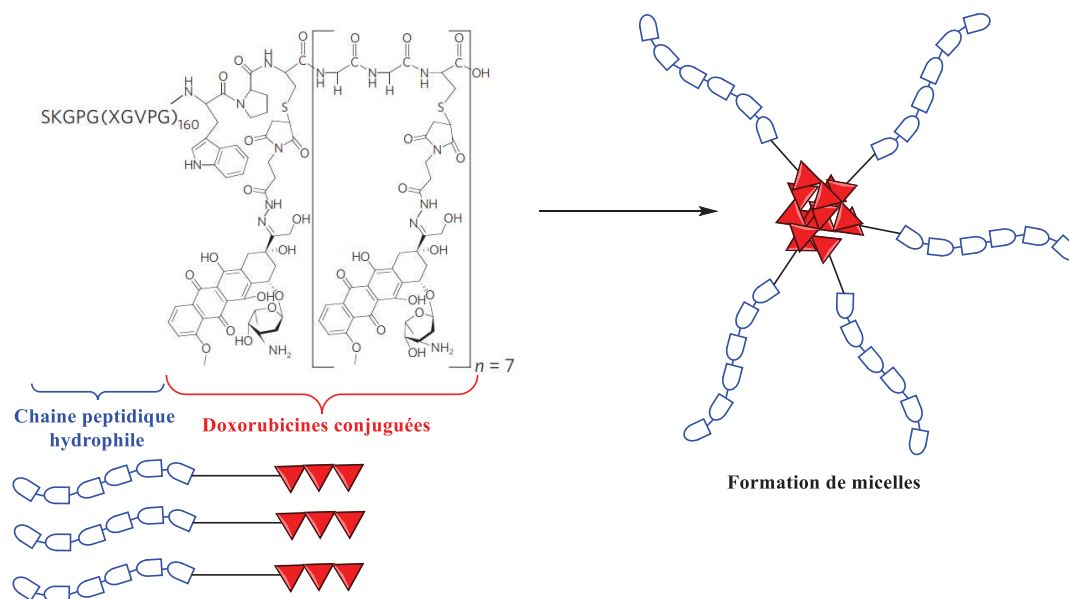


Schéma 36 : Structure des conjugués doxorubicine-peptides (structure du conjugué issue de *Nat Mater* **2009**, 8 (12), 993-999¹⁶⁰)

Des nanoparticules magnétiques¹⁶¹, lipidiques¹⁶² ou de silice¹⁶³, des liposomes¹⁶⁴, des polymères¹⁶⁵, des dendrimères¹⁶⁶ et des cyclodextrines¹⁶⁷ ont par ailleurs été employés avec succès comme transporteurs de la doxorubicine.

La co-délivrance de siARNs et de drogues par des nanoparticules a été étudiée en raison de leur capacité à s'accumuler au niveau des tumeurs, engendrant une augmentation de la perméabilité des cellules (**Schéma 37**).¹⁶⁸ Elles se présentent sous la forme de dendrimères, de polymères ou de composés inorganiques.¹⁶⁹ Des exemples de leur conjugaison à des oligonucléotides *via* des liens contenant des ponts disulfures ont été décrits dans l'introduction générale. Néanmoins, des difficultés persistent, en particulier concernant la libération des composés dans les cellules. En effet, les composés véhiculés doivent être libérés des nanoparticules puis sortir des endosomes suffisamment rapidement pour ne pas être dégradés dans les lysosomes.¹⁷⁰

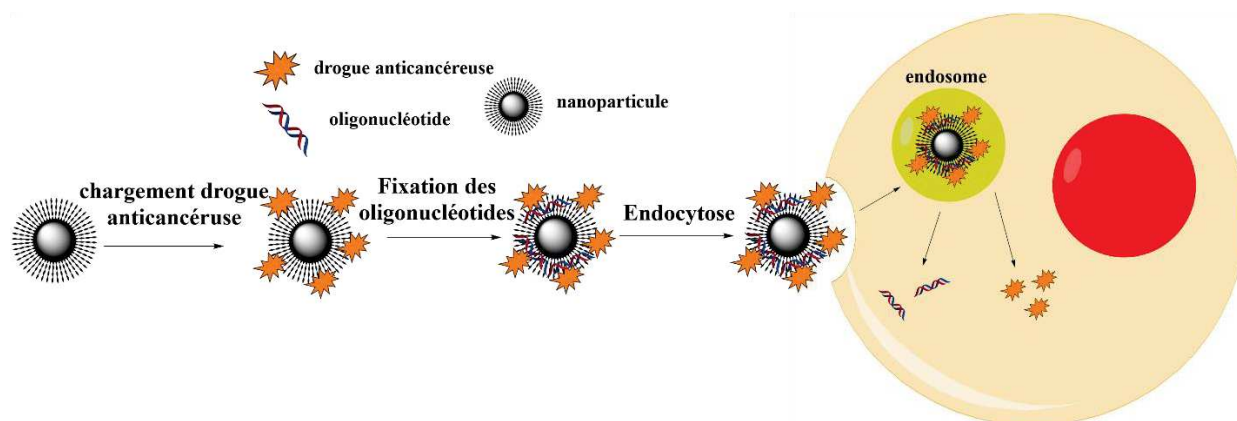


Schéma 37 : Mécanisme général de co-délivrance de molécules anticancéreuses et d'oligonucléotides en utilisant des nanoparticules

Une autre difficulté de la co-délivrance de siARNs et de molécules anticancéreuses réside dans leurs propriétés physicochimiques antinomiques. Les oligonucléotides ont des difficultés à pénétrer dans les cellules de par leurs charges négatives alors que les drogues ont des problèmes de solubilité et d'hydrophobie. Des résultats intéressants ont néanmoins été obtenus, par exemple sur des lignées cellulaires de cancer du sein.¹⁷¹ Des micelles formées de copolymères blocs poly(éthylène oxyde) (PEO) et poly(propylène oxyde) (PPO) et d'un dérivé de la vitamine E, le D- α -tocophérol polyéthylène glycol succinate (TPGS), servant de surfactant, ont permis l'encapsulation de la doxorubicine. Ces micelles ont ensuite été fonctionnalisées par du chitosan cationique, ce dernier fixant les siARNs par interactions électrostatiques. De l'acide folique a enfin été greffé pour favoriser la pénétration cellulaire (**Figure 30**). Les tests biologiques ont démontré une efficacité accrue par rapport à la délivrance de composés uniques.

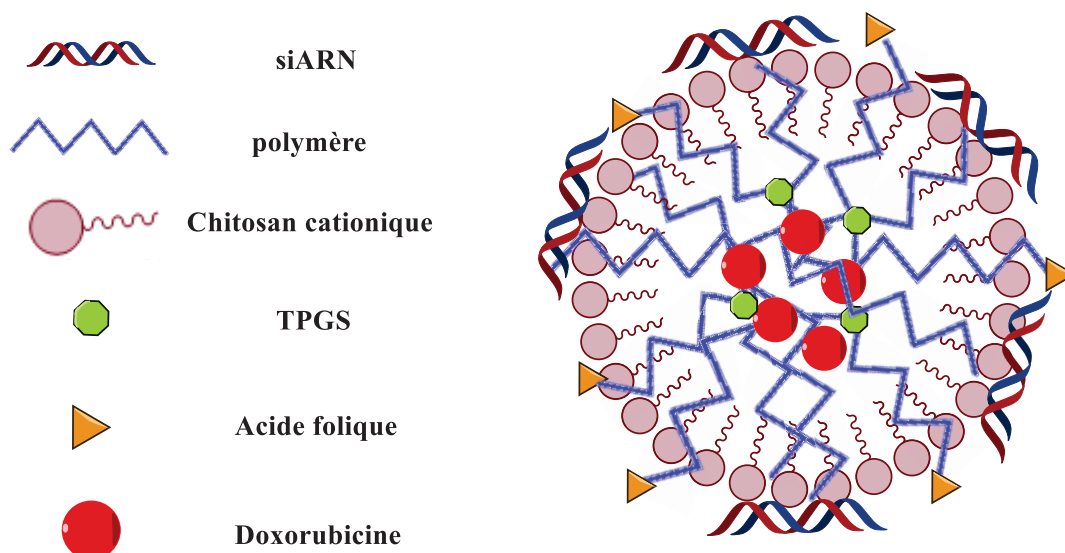


Figure 30 : Vectorisation de siARNs et de doxorubicine par une nanomicelle

Une stratégie similaire a été appliquée sur des cellules ovariennes résistantes aux traitements classiques.^{163b} Des nanoparticules de silice mésoporeuse ont été modifiées avec du 3-(triéthoxysilyl)propylisocyanate, pour fonctionnaliser les nanoparticules. La doxorubicine a été encapsulée dans les pores puis la surface a été fonctionnalisée par des dendrimères grâce à des fonctions urées, permettant ensuite la fixation des siARNs. Une efficacité anticancéreuse 132 fois supérieure à celle de la doxorubicine seule a ainsi été mesurée, en raison de l'inhibition des voies génétiques induisant la multirésistance aux drogues.

Un dernier exemple, publié par l'équipe de B. Zhu, utilise comme vecteur de co-délivrance des nanoparticules de sélénium fonctionnalisées, transportant de la doxorubicine et des siARNs ciblant l'homéoprotéine humaine (**Schéma 38**).¹⁷² Cette dernière régule l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire, et est surexprimée au niveau de tumeurs.

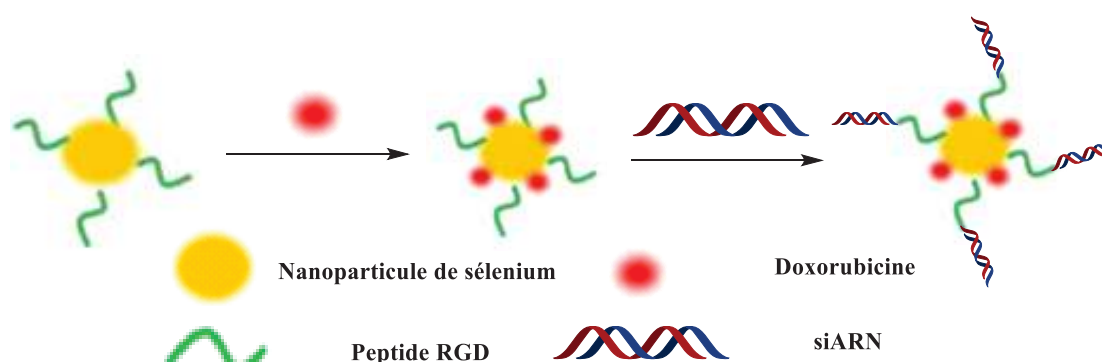


Schéma 38 : Co-délivrance de doxorubicine et de siARNs par des nanoparticules de sélénium (schéma adapté d'après *Int J Nanomedicine* 2018; 13: 143–159¹⁷²)

Le sélénium a été sélectionné pour sa biocompatibilité et sa faible toxicité en milieu biologique. Les nanoparticules ont tout d'abord été greffées avec des peptides RGD favorisant

la pénétration cellulaire, puis la doxorubicine a été fixée sur le sélénium. Enfin, les siARNs ont été attachés aux peptides chargés positivement par des interactions électrostatiques. A pH acide, tel que dans les endosomes, la modification des charges libère alors la doxorubicine et les siARNs. Ces nanoparticules ont démontré une forte amélioration de la pénétration cellulaire et une activité antitumorale supérieure à celle observée avec chacun des composés étudiés individuellement.

Ces différents exemples ont en commun de vectoriser les différents composés par des interactions non covalentes. A notre connaissance, aucune méthode utilisant une modification covalente entre les siARNs et des drogues anticancéreuses n'a été décrite. En effet, les couplages covalents peuvent modifier voire bloquer l'efficacité des composés. Pour pallier ce problème, la stratégie que nous avons développée vise à utiliser un lien covalent auto-immolable, permettant la libération du siARN et de la doxorubicine non modifiés.

2. Présentation des liens auto-immolables

Les liens auto-immolables permettent de lier deux molécules sous la forme d'un conjugué stable, en limitant les gênes stériques. La conjugaison s'effectue par une extrémité du lien, tandis que l'autre extrémité est modifiée par une liaison pouvant être coupée en réponse à un stimulus.¹⁷³ La rupture de cette liaison sert de déclencheur au départ du lien, aboutissant à la rupture de la liaison à la molécule conjuguée.¹⁷⁴

Ils ont à l'origine été utilisés comme des outils pour le développement de prodrogues pouvant répondre à différents types de stimuli.¹⁷⁵ La première description remonte à 1981 par l'équipe de J. Katzenellenbogen, avec une lysine fonctionnalisée par un alcool aminobenzyle, conjugué à une 4-nitroaniline par une fonction carbamate (**Schéma 39**).¹⁷⁶ La coupure de la liaison peptidique par la trypsine engendre un acide carbamique instable par un mécanisme d'élimination 1,6, entraînant une décarboxylation libérant la nitroaniline.

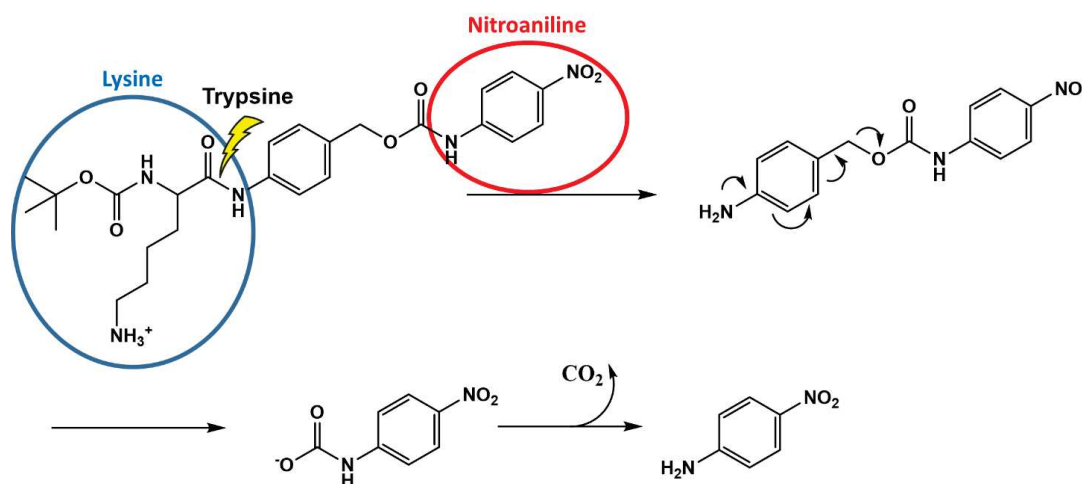


Schéma 39 : Structure et réarrangement du premier lien auto-immolable décrit dans la littérature¹⁷⁶

Par la suite, l'intérêt de ces liens a été démontré pour faciliter la délivrance¹⁷⁷ ou effectuer des études par fluorescence.¹⁷⁸ En effet, la fluorescence d'un composé peut par exemple être éteinte (ou « quenchée ») par un groupement, puis, dans les conditions souhaitées, la rupture de la liaison entraîne la libération du fluorophore, induisant l'émission intense de fluorescence.¹⁷⁹

Le stimulus est de nature très variable : par oxydation¹⁸⁰, par réduction¹⁸¹, par irradiation¹⁸², en fonction du pH^{181a, 183} ou encore en présence d'enzymes.^{179a, 179c, 184} Des polymères^{179b, 185} ou des dendrimères¹⁸⁶ ont également été exploités pour libérer des quantités importantes de petites molécules fixées.^{173, 187} Deux principaux mécanismes sont utilisés pour le départ de ces liens auto-immolables¹⁸⁸ :

- Le premier mécanisme utilise des réactions en cascade, en particulier par des transferts d'électrons engendrant des éliminations 1,4 ou 1,6.¹⁸⁹ Cette méthode est généralement utilisée avec des liens aromatiques conjugués. La rupture de la liaison entre un groupement protecteur porté par une amine, un hydroxyle ou un thiol initie une cascade électronique aboutissant à la libération de la molécule native, en particulier par une réaction de décarboxylation (**Schéma 40**).^{178, 190} La cinétique est assez rapide, permettant la libération des composés d'intérêt.

Ce type de lien a notamment servi pour la formation de conjugués drogue-anticorps, ou ADC (« antibody-drug conjugate »), en particulier dans le cadre du traitement de tumeurs.^{175, 191} En effet, les anticorps sont connus pour cibler très efficacement les cellules cancéreuses.^{23, 192} Par exemple, une liaison amide sensible aux protéases cellulaires permet ensuite la séparation des deux composants dans le cytoplasme, activant l'action cytotoxique de la molécule.

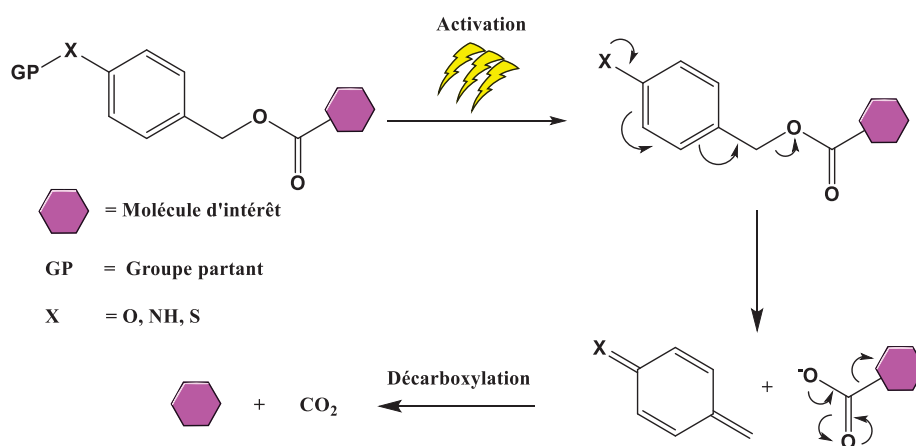


Schéma 40 : Libération d'une molécule d'intérêt par décomposition d'un lien auto-immolable par cascade de transferts d'électrons

- Le deuxième mécanisme consiste en la libération des molécules par des réactions de cyclisation - élimination intramoléculaires, par attaque d'un nucléophile démasqué (amine, alcool, thiol) sur un dérivé d'acide carbonique (ester, amide, carbamate, carbonate).^{178, 193} De nombreux liens basés sur ce mécanisme utilisent des dérivés des

acides 4-amino ou 4-hydroxybutanoïques.¹⁹⁴ Les premiers exemples décrits sont issus des équipes de S. Lane¹⁹⁵ et R. Borchardt.¹⁹⁶ La libération de la molécule d'intérêt s'accompagne de la formation d'urées ou d'amides cycliques, suite au démasquage d'une amine terminale (**Schéma 41**). Ces réactions possèdent généralement une cinétique plus lente que celles utilisant des transferts électroniques.

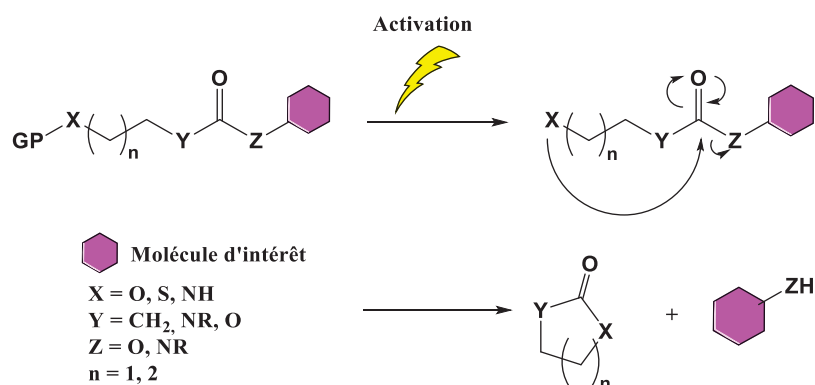


Schéma 41 : Libération d'une molécule d'intérêt par décomposition d'un lien auto-immolable par cyclisation intramoléculaire

Néanmoins, ces deux méthodes sont complémentaires et leur combinaison dans une approche prodrogue est présentée sur le **Schéma 42**.¹⁸⁹ La déprotection de l'amine engendre une cascade électronique, aboutissant à la libération d'une seconde amine. Cette dernière initiant ensuite le réarrangement final du lien par cyclisation, suivie par la libération de CO₂.

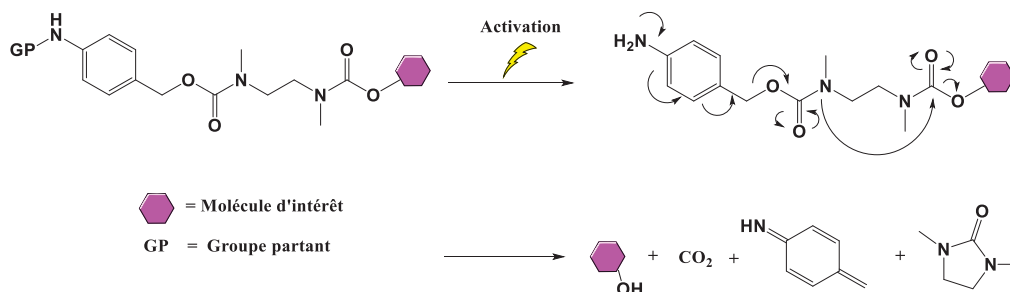


Schéma 42 : Combinaison des deux stratégies de liens auto-immolables

La seconde méthode est la plus utilisée avec des ponts disulfures.^{174, 178} En milieu réducteur, la libération d'un thiol déclenche le réarrangement du lien par cyclisation intramoléculaire au niveau d'un carbonate, d'un carbamate ou plus rarement d'un ester ou d'un amide.¹⁹⁷ Deux mécanismes de réarrangement du lien sont proposés (**Schéma 43**).¹⁹⁸ Ces derniers interviennent en général simultanément, libérant dans les deux cas la molécule d'intérêt.^{174, 197d}

- Voie A : Le réarrangement du lien se fait par l'attaque directe du thiolate sur le carbonate ou le carbamate, entraînant la formation d'un cycle 1,3-oxathiolan-2-one.¹⁹⁹
- Voie B : Le réarrangement intervient en deux étapes, par la formation de thiirane et libération de CO₂.²⁰⁰

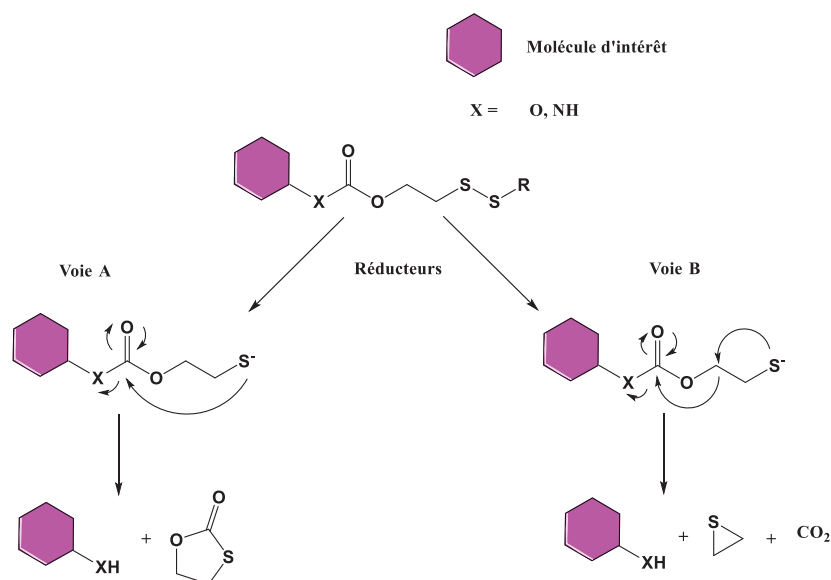


Schéma 43 : Mécanismes de réarrangement des liens auto-immolables en réponse à des conditions réductrices

Un exemple intéressant de molécules contenant un lien auto-immolable à pont disulfure concerne les prodrugs de paclitaxel, une molécule anticancéreuse fréquemment utilisée. Des liens disulfanyléthylcarbonates avec des chaînes alkyles portant des acides carboxyliques, des hydroxyles ou des amines, ont été fixés sur l'un des hydroxyles du paclitaxel (**Schéma 44**).²⁰¹ Ce lien est stable dans le milieu extracellulaire, puis, en présence d'agents réducteurs, la coupure du pont disulfure libère un thiolate, induisant des réarrangements intramoléculeux par les mécanismes décrits précédemment.

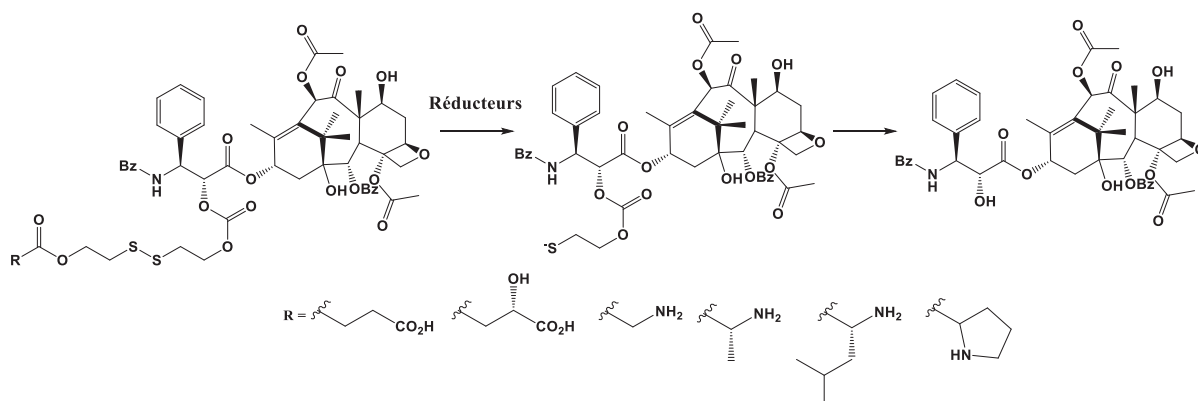


Schéma 44 : Exemples de prodrugs de paclitaxel

Dans le cadre de notre stratégie de co-délivrance de siARNs conjugués à de la doxorubicine, nous avons utilisé un lien auto-immolable disulfanyléthylcarbamate introduit sur la fonction amine de la doxorubicine. La conjugaison à des ARNs modifiés a ensuite été effectuée par des réactions d'échange thiol-disulfure.

3. Préparation des ARNs conjugués à la doxorubicine

3.1. Principe

L'objectif de notre étude est de conjuguer le brin sens du siARN ciblant le sarcome d'Ewing à la doxorubicine par un lien auto-immolable labile en milieu réducteur introduit en position 2' d'un nucléoside.

Nous avons pour cela utilisé un lien composé de deux ponts disulfures séparés par une chaîne carbonée aliphatique ou aromatique, noté **R** sur le **Schéma 45**.

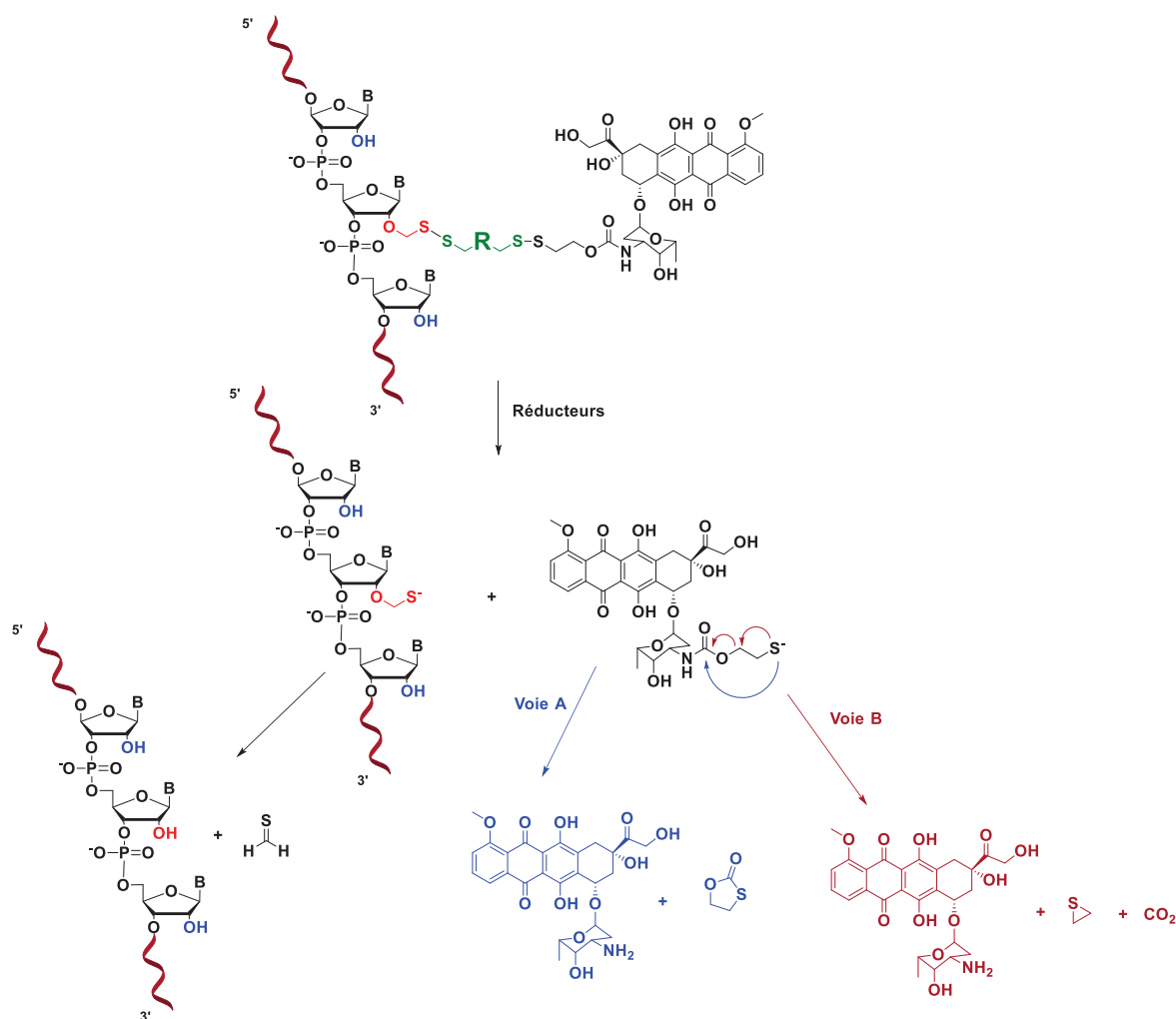


Schéma 45 : Mécanismes de réarrangement du lien auto-immolable entre le siARN et la doxorubicine

En milieu réducteur, par exemple en présence de glutathion, les deux ponts sont coupés, entraînant la libération du siARN et de la doxorubicine natifs par réarrangement des liens auto-immolables. D'une part, pour l'ARN, l'hémithioacétal instable évolue spontanément vers la récupération du nucléoside 2'-OH par départ de thioformaldéhyde, comme nous l'avons vu dans le chapitre I. D'autre part, pour la doxorubicine, le réarrangement s'effectue selon les deux mécanismes décrits précédemment (**Schéma 43**). Le départ de 1,3-oxathiolan-2-one (voie A), ou le départ de thiirane et de dioxyde de carbone (Voie B) permettent ainsi la récupération de la doxorubicine native (**Schéma 45**).

3.2. Stratégie de synthèse

La conjugaison à la doxorubicine a été effectuée en solution entre la doxorubicine activée par un groupement 2-(disulfanylpyridine)-éthylcarbamate, obtenue en trois étapes à partir de la doxorubicine non modifiée, et un ARN modifié par un lien 2'-O-((5-(pyridin-2-yl)disulfanyl)alkyl)disulfanyl)méthyle (**Schéma 46**). Le couplage n'a pas été effectué de manière supportée en raison de la dégradation de la doxorubicine lors de l'étape de déprotection à l'ammoniaque.

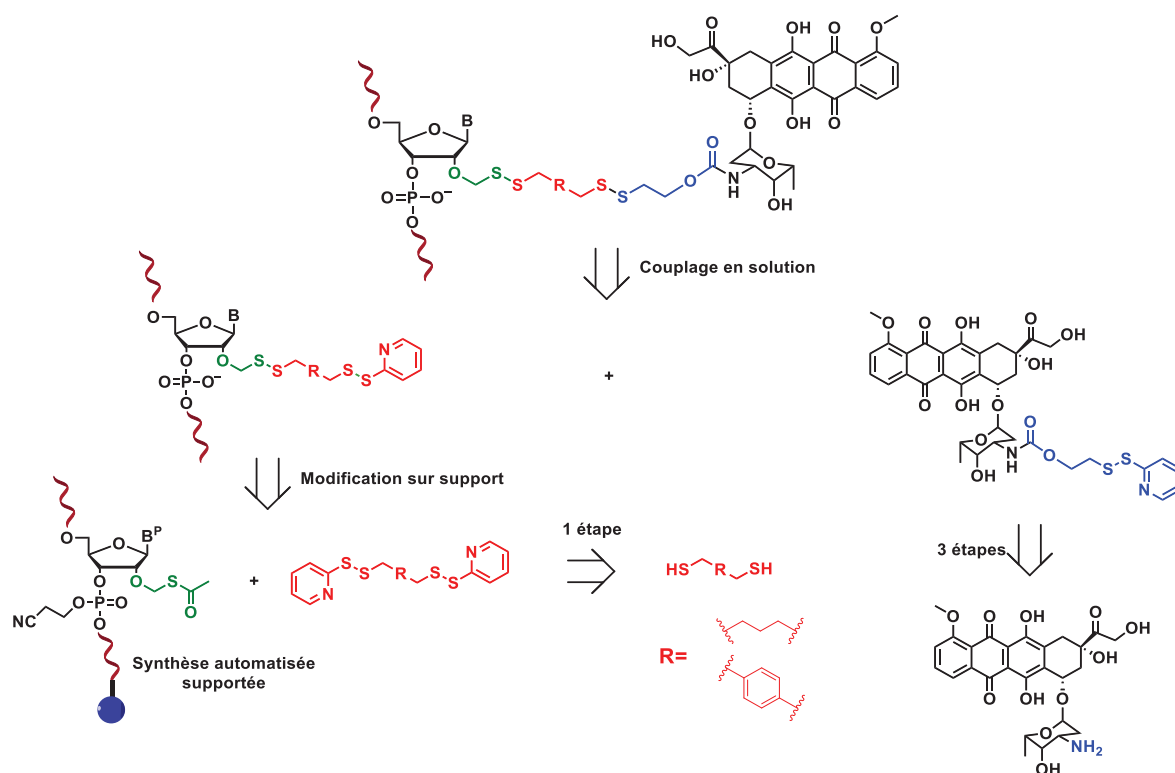


Schéma 46 : Rétrosynthèse des siARNs conjugués à la doxorubicine

Les ARNs ont été synthétisés sur support par une réaction similaire à celle utilisée dans le chapitre précédent sur les nucléosides portant des groupements 2'-O-AcSM. L'assemblage des ARNs a été effectué par synthèse automatisée, à partir des synthons phosphoramidites 2'-O-AcSM et 2'-O-PivOM des quatre ribonucléotides. Le lien 2'-O-((5-(pyridin-2-yl)disulfanyl)alkyl)disulfanyl)méthyle a été formé sur support en présence de butylamine et

d'un réactif alkylbis(disulfanylpyridine) portant deux ponts disulfures activés, préalablement synthétisé à partir de dithiols commerciaux en une étape. Deux types de liens ont été envisagés pour évaluer l'influence de leur rigidité. Le premier contient une chaîne pentane aliphatique, pour obtenir des ARNs 2'-O-((5-(pyridin-2-yl)disulfanyl)pentyl)disulfanyl)méthyles (2'-O-PySSPSSM), le second un squelette benzyle aromatique, formant des ARNs 2'-O-((4-((pyridin-2-yl)disulfanyl)méthyl)benzyl)disulfanyl)méthyles (2'-O-PySSMBnSSM).

3.3. Synthèse des précurseurs au couplage

La stratégie de synthèse développée nécessite la préparation préalable de la doxorubicine modifiée avec un lien éthyldisulfanylpyridine et des réactifs alkylbis(disulfanylpyridine).

3.3.1. *Synthèse de la doxorubicine modifiée par un lien éthyldisulfanylpyridine*

La fonction amine libre présente sur le sucre de la doxorubicine a été transformée sous la forme d'un carbamate portant un lien éthyldisulfanylpyridine.

La synthèse a été réalisée en trois étapes en suivant un protocole décrit par A. Lopez Cortajarena (**Schéma 47**).²⁰² La première étape est la formation du lien éthyldisulfanylpyridine sur le β -mercaptoéthanol, par réaction d'échange thiol-disulfure entre le β -mercaptoéthanol et la 2,2'-dithiodipyridine. Le 2-(pyridin-2-yl)disulfanyléthanol **21** a été obtenu avec un rendement de 76% après purification par chromatographie sur gel de silice. La deuxième étape permet d'activer l'hydroxyle de l'éthanol sous la forme d'un carbonate portant un substituant 4-nitrophényle, en formant le 4-nitrophényl 2-(pyridin-2-yl)disulfanyléthylcarbonate **22**. La réaction a été effectuée par addition de bis(4-nitrophényl)carbonate et de DIEA sur le 2-(pyridin-2-yl)disulfanyléthanol **21** en 4 h dans le DCM et le produit **22** a été obtenu avec un rendement de 36%. Ce faible rendement s'explique par la difficulté à séparer le composé attendu de l'excès de bis(4-nitrophényl)carbonate, nécessitant ainsi plusieurs purifications successives par chromatographie sur colonnes de gel de silice. Enfin, la dernière étape consiste à l'attaque de l'amine de la doxorubicine sur le carbonate activé du composé **22** pour former la fonction carbamate. Cette réaction a été effectuée dans le DMF en présence de DIEA pendant 16 h. La (2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)éthylcarbamate)doxorubicine **23** a été isolée après purification sur gel de silice sous la forme d'un solide rouge avec un rendement de 93%. Le produit a été caractérisé par RMN ¹H et ¹³C et spectrométrie de masse HR-MS.²⁰³

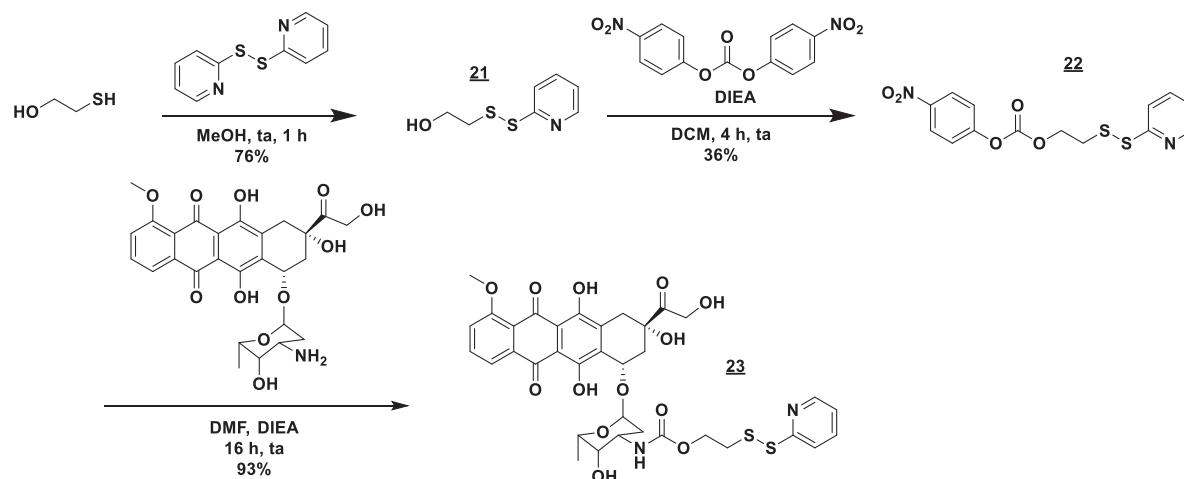


Schéma 47 : Synthèse de la (2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)-éthylcarbamate doxorubicine **23**

3.3.2. Synthèse des différents liens alkylbis(disulfanyl)pyridine

Pour les synthèses des liens alkylbis(disulfanyl)pyridine, deux dithiols différents ont été utilisés, le pentanedithiol pour le lien aliphatique flexible (C₅) et le benzènediméthanethiol (Bn) pour le lien aromatique rigide. Les synthèses du 1,5-bis(pyridin-2-yl)disulfanyl)pentane **24** et du 1,4-bis((pyridin-2-yl)disulfanyl)méthyl)benzène **25** ont été effectuées en présence de la 2,2'-dithiodipyridine en solution dans le méthanol (**Schéma 48**).

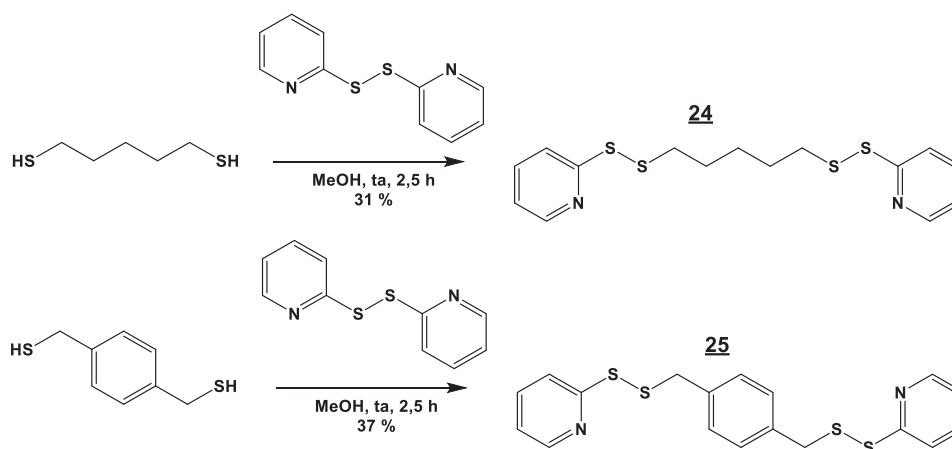


Schéma 48 : Synthèse des réactifs alkylbis(disulfanyl)pyridine **24** (avec une chaîne alkyle C₅) et **25** (avec un diméthylbenzène)

Lors de la réaction, la polymérisation des réactifs a par ailleurs été détectée, indiquant une compétition entre la réaction sur la 2,2'-dithiodipyridine et la réaction intermoléculaire entre plusieurs précurseurs. Une première purification sur gel de silice a permis d'éliminer ces polymères formés durant la réaction. Une seconde purification en phase inverse sur gel de silice C₁₈, a conduit aux réactifs **24** et **25**, avec des rendements respectifs de 31% et 37%.

4. Synthèse et évaluation des siARNs liés à la doxorubicine

4.1. Synthèse d'ARNs portant des liens contenant un groupement alkyldisulfanylpyridine

Nous avons introduit la doxorubicine en deux positions différentes, à l'extrémité 5' et au milieu de la séquence du brin sens du siARN ciblant le sarcome d'Ewing, afin d'évaluer si sa position pouvait avoir une influence sur les propriétés du siARN. Elle a donc été conjuguée à une guanosine située à l'extrémité 5' (**5'-end**) et à une cytidine présente au milieu de la séquence (**Middle**) (**Figure 31**).

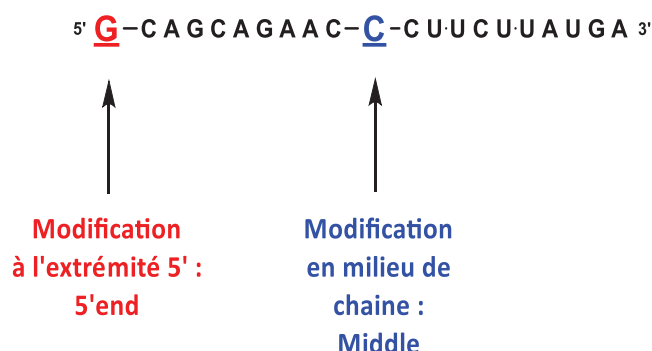


Figure 31 : Position des nucléosides conjugués à la doxorubicine sur l'ARN

La combinaison des molécules de doxorubicine sur ces deux positions avec les deux types de liens envisagés a permis de synthétiser quatre ARNs conjugués différents. Les modifications 2'-O-PySSPSSM ont été introduites sur les ARNs **26** et **27**, respectivement en position **5'end** et **Middle**, tandis que les modifications 2'-O-PySSMBnSSM ont été introduites sur les ARNs **28** et **29**, également en positions respectives **5'end** et **Middle** (**Tableau 8**).

N°	Lien	Séquences des ARNs synthétisés
26	5'end-C₅	5' G _{2'-O-PySSPSSM} CA GCA GAA CCC UUC UUA UGA ^{3'}
27	Middle-C₅	5' GCA GCA GAA C _{2'-O-PySSPSSM} C UUC UUA UGA ^{3'}
28	5'end-Bn	5' G _{2'-O-PySSMBnSSM} CA GCA GAA CCC UUC UUA UGA ^{3'}
29	Middle-Bn	5' GCA GCA GAA C _{2'-O-PySSMBnSSM} C UUC UUA UGA ^{3'}

Tableau 8 : Séquences des ARNs **26** à **29**

Les ARNs **26** à **29** ont été obtenus en deux étapes après l'assemblage de l'ARN sur support solide (**Schéma 49**).

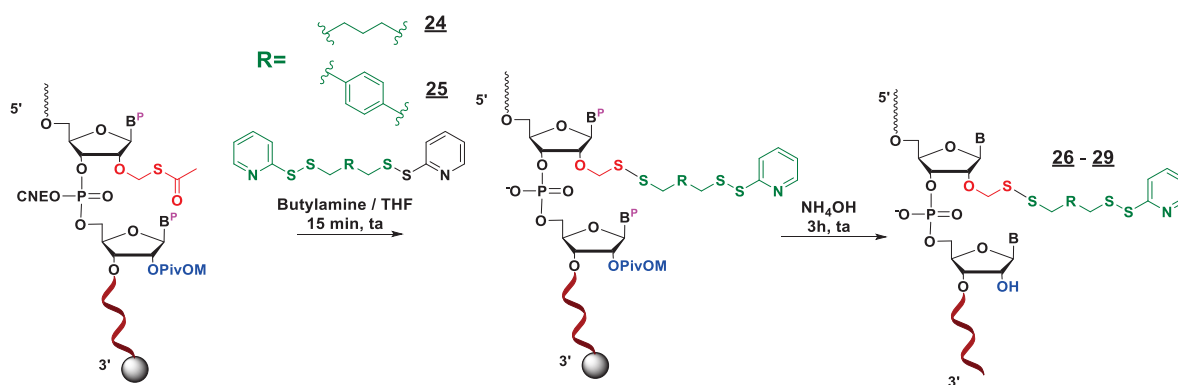


Schéma 49 : Synthèse des ARNs **26** à **29** par transformation post-synthétique

La première étape correspond à l'introduction des liens en position 2', réalisée sur support à partir des réactifs **24** et **25** (**Schéma 49**). Dans un second temps, un traitement avec une solution d'ammoniaque pendant 3 h permet de décrocher les ARNs du support et déprotéger les bases et les positions 2' comportant les groupements 2'-O-PivOM pour obtenir les ARNs **26** à **29**.

4.1.1. Mise au point de la synthèse des ARNs modifiés par un lien alkyldis(disulfanyl)pyridine

Pour mettre au point les conditions de couplage des liens alkyldis(disulfanyl)pyridine, nous avons choisi d'utiliser le réactif **25**, plus disponible car plus facile à obtenir en grandes quantités en raison de l'étape de purification. En suivant la méthode développée dans le chapitre I, nous avons utilisé 100 équivalents de réactif **25** pendant 15 min dans un mélange THF / Butylamine (3 :1, v/v) pour obtenir les ARNs **28** et **29**.

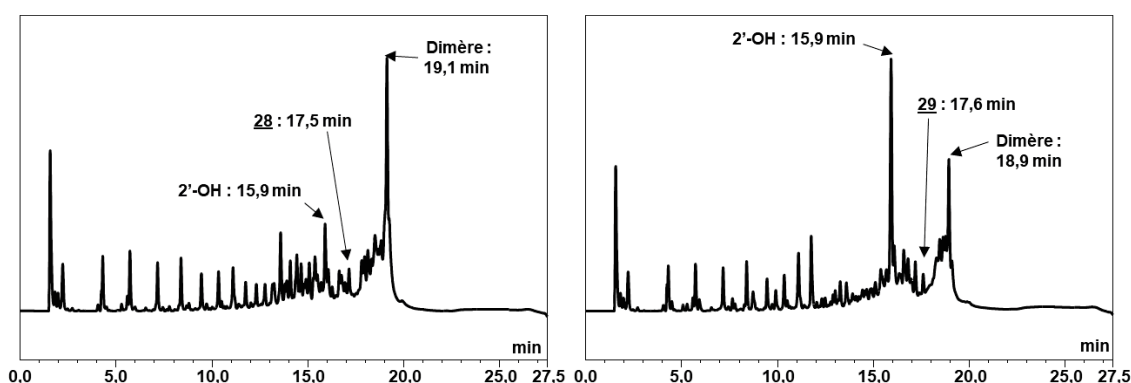


Figure 32 : Chromatogrammes IEX-HPLC des bruts de déprotection des ARNs **28** et **29** après réaction avec 100 équivalents de réactif **25**

L'analyse des chromatogrammes par IEX-HPLC montre dans les deux cas de nombreux pics (**Figure 32**) parmi lesquels deux pics majoritaires ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Il s'agit de l'ARN 2'-OH, correspondant à une réaction incomplète et un dimère d'ARN dont les deux brins non complémentaires sont liés par des ponts disulfures (**Figure 33**).

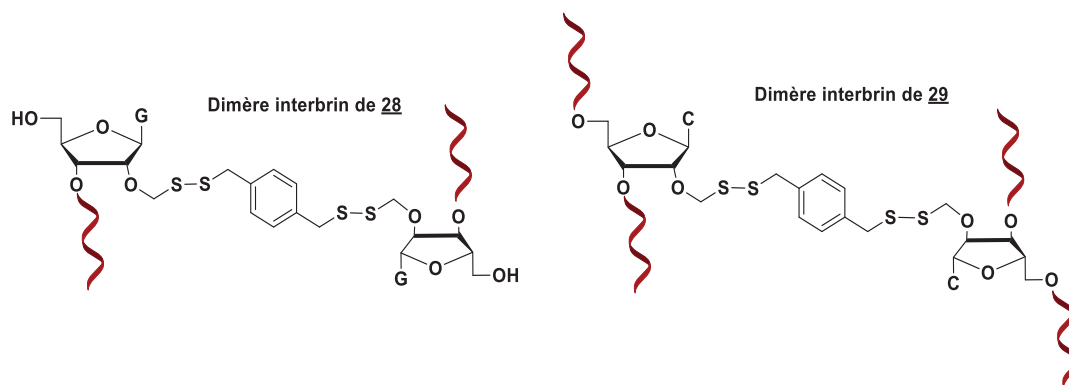


Figure 33 : Structure des dimères interbrins formés lors de la synthèse des ARNs **28** et **29**

Pour favoriser la formation des ARNs **28** et **29**, nous avons fait varier le nombre d'équivalents de réactif **25** et mesuré les proportions relatives de trois espèces remarquables sur les chromatogrammes IEX-HPLC à 260 nm (**Figure 34**). Elles correspondent à l'ARN 2'-OH, à l'ARN d'intérêt **28** ou **29** et au dimère d'ARN.

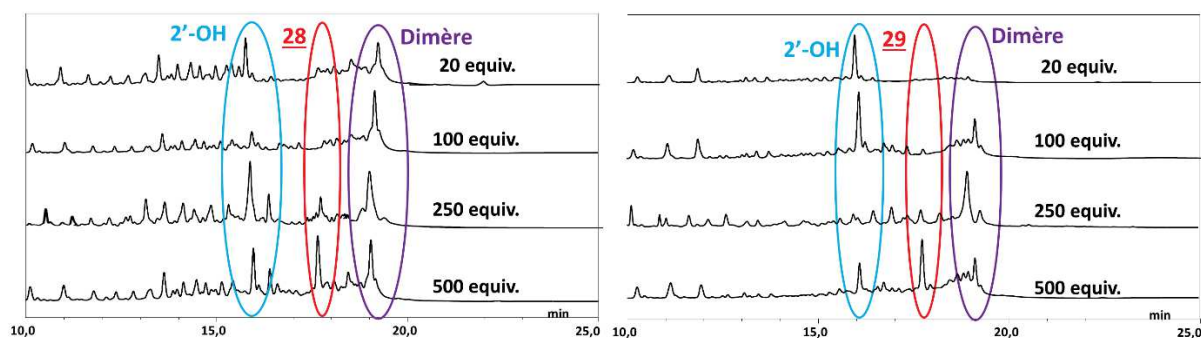


Figure 34 : Chromatogrammes IEX-HPLC des ARNs **28** et **29** bruts après réaction avec différentes quantités de réactif **25**

Les chromatogrammes IEX-HPLC révèlent des proportions relatives de ces trois composés différents selon la position du lien à introduire, à l'extrémité 5' ou en milieu de l'ARN. En effet, pour l'ARN modifié à l'extrémité 5', lors des réactions avec 20 ou 100 équivalents de **25**, le produit majoritaire est le dimère alors que, lorsque que la réaction intervient en milieu de séquence, une forte proportion d'ARN 2'-OH est obtenue (**Figure 34**). Une explication potentielle à ces différences est la meilleure accessibilité de la position 5', qui facilite les réactions interbrins, tandis qu'elles sont moins favorables en milieu de chaîne en raison de potentielles gênes stériques.

La proportion des ARNs **28** et **29** attendus augmente nettement avec les quantités de réactif **25** utilisées. Pour 20 ou 100 équivalents, moins de 10% de produit désiré sont obtenus alors qu'avec 500 équivalents, les ARNs **28** et **29** représentent les espèces majoritaires. La réaction n'a pas été testée avec des quantités supérieures du réactif **25** en raison de problèmes de solubilité à des concentrations plus élevées.

4.1.2. *Synthèse des ARNs 26 à 29 porteurs de liens alkylbis(disulfanylpyridine)*

Les conditions utilisant 500 équivalents de réactifs **24** ou **25** ont donc été sélectionnées pour la synthèse des oligonucléotides **26** à **29** (Tableau 9). Ainsi, les ARNs **26** et **27**, portant le lien pentyle entre les deux ponts S-S, respectivement aux deux positions 5'end-C₅ et Middle-C₅, ont été préparés sur support, avec 500 équivalents du réactif **24** dans un mélange THF / Butylamine (3 :1, v/v) pendant 15 min (Figure 35). Ces conditions ont aussi été utilisées pour les ARNs **28** et **29** portant le lien diméthylbenzène, avec 500 équivalents de réactif **25**.

N°	Lien	m/z calculée	m/z obtenue ^a	ARN d'intérêt ^b (%)	Quantités isolées ^c (nmol)
26	5'end-C ₅	6945,6	6944,4	32%	20,3
27	Middle-C ₅	6945,6	6944,1	28%	21,2
28	5'end-Bn	6979,6	6978,6	24%	38,6
29	Middle-Bn	6979,6	6978,1	35%	45,7

Tableau 9 : Résultats et caractérisation des ARNs **26** à **29**

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ([M-H])

^bPourcentage du pic de l'ARN d'intérêt en aire relative du chromatogramme IEX- HPLC du brut de déprotection à 260 nm

^cQuantités isolées après purification mesurées par spectrophotométrie à 260 nm à partir d'une synthèse à l'échelle de 1 µmol

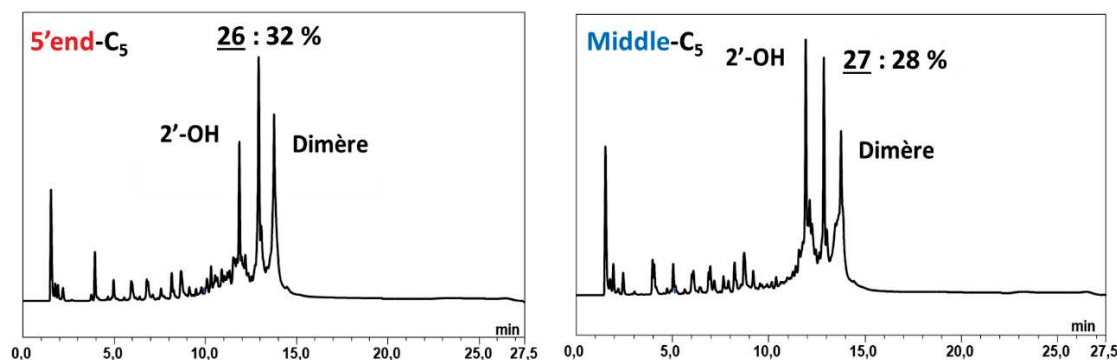


Figure 35 : Chromatogrammes IEX-HPLC des bruts de réaction avec 500 équivalents de réactif **24** pour obtenir les ARNs **26** et **27**

Les ARNs **26** à **29** ont été purifiés par IEX-HPLC, dessalés et caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 36). Les spectres de masse montrent la présence de trois pics dans la zone correspondant à la masse attendue (6945,6 Da pour **26** et **27** ; 6979,6 Da pour **28** et **29**). La coupure partielle des ponts disulfures lors du tir du laser est détectée (pertes de masse de 110 Da et de 243 Da pour **26** et **27** et de 110 Da et 277 Da pour **28** et **29**), expliquant la détection des masses des espèces sous forme thiolate.

Les proportions déterminées pour les ARNs **26** à **29** sont relativement similaires, environ 30% (Tableau 9). Néanmoins, le lien diméthylbenzène présent dans **28** et **29** permet

une séparation des espèces par IEX-HPLC plus aisée, rendant la purification plus efficace. En effet, malgré des proportions d'ARNs d'intérêt similaires dans le brut de déprotection, les quantités d'ARNs **28** et **29** isolées sont deux fois supérieures à celles des ARNs **26** et **27**.

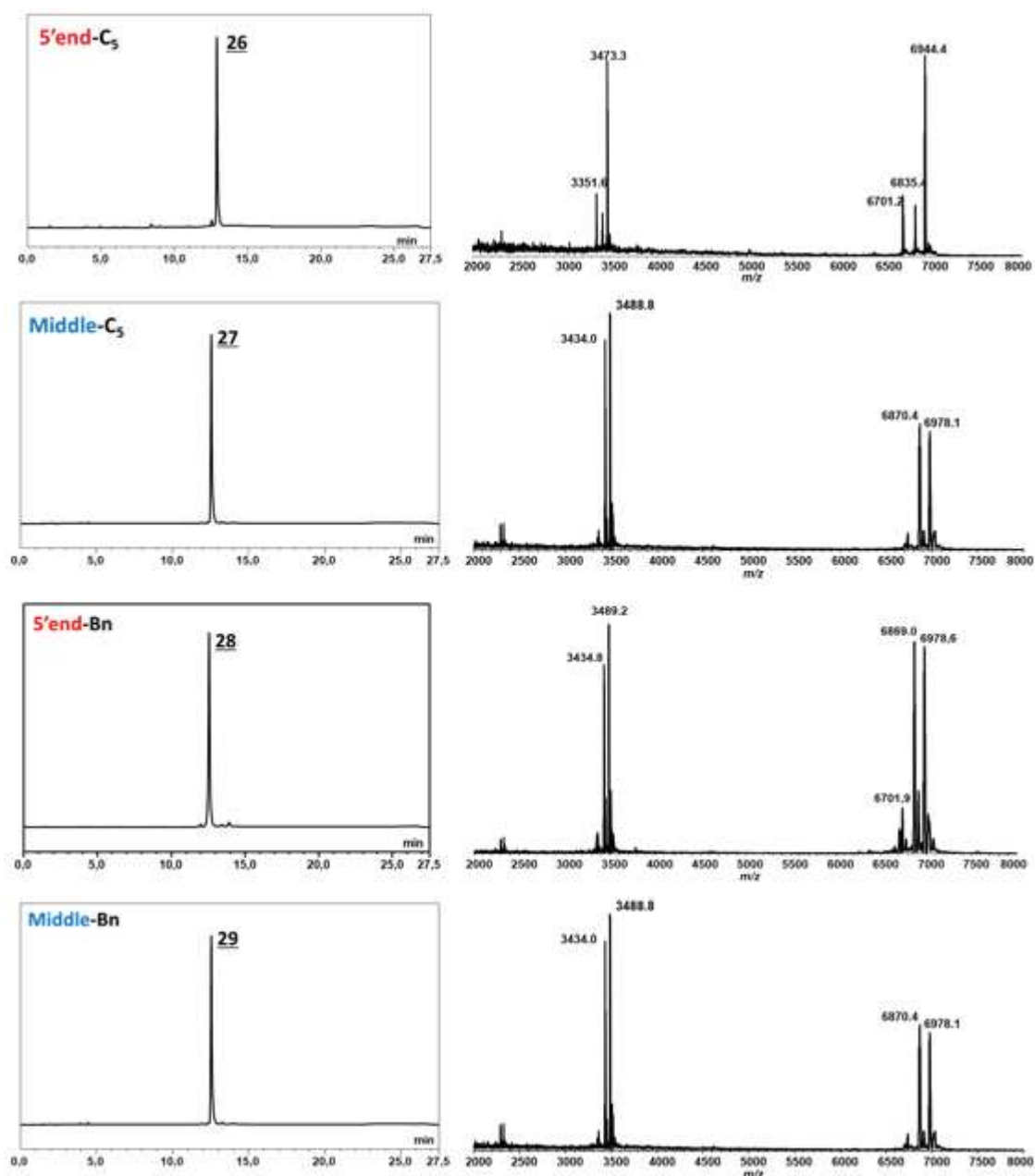


Figure 36 : Chromatogrammes HPLC et spectres de masse MALDI-TOF des ARNs **26** à **29** purifiés

4.2. Synthèse des ARNs conjugués à la doxorubicine

4.2.1. ARNs conjugués à une molécule de doxorubicine

Les couplages en solution entre les quatre ARNs précurseurs précédemment préparés 2'-O-PySSPSSM **26** et **27** et 2'-O-PySSMBnSSM **28** et **29** et la doxorubicine activée sous forme S-S-pyridine **23** ont permis d'obtenir respectivement les quatre ARNs **30**, **31**, **32** et **33**

conjugués à la doxorubicine. La réaction a été menée en présence d'un large excès de doxorubicine (100 équivalents par rapport à l'ARN) et se décompose en deux étapes successives (**Schéma 50**) :

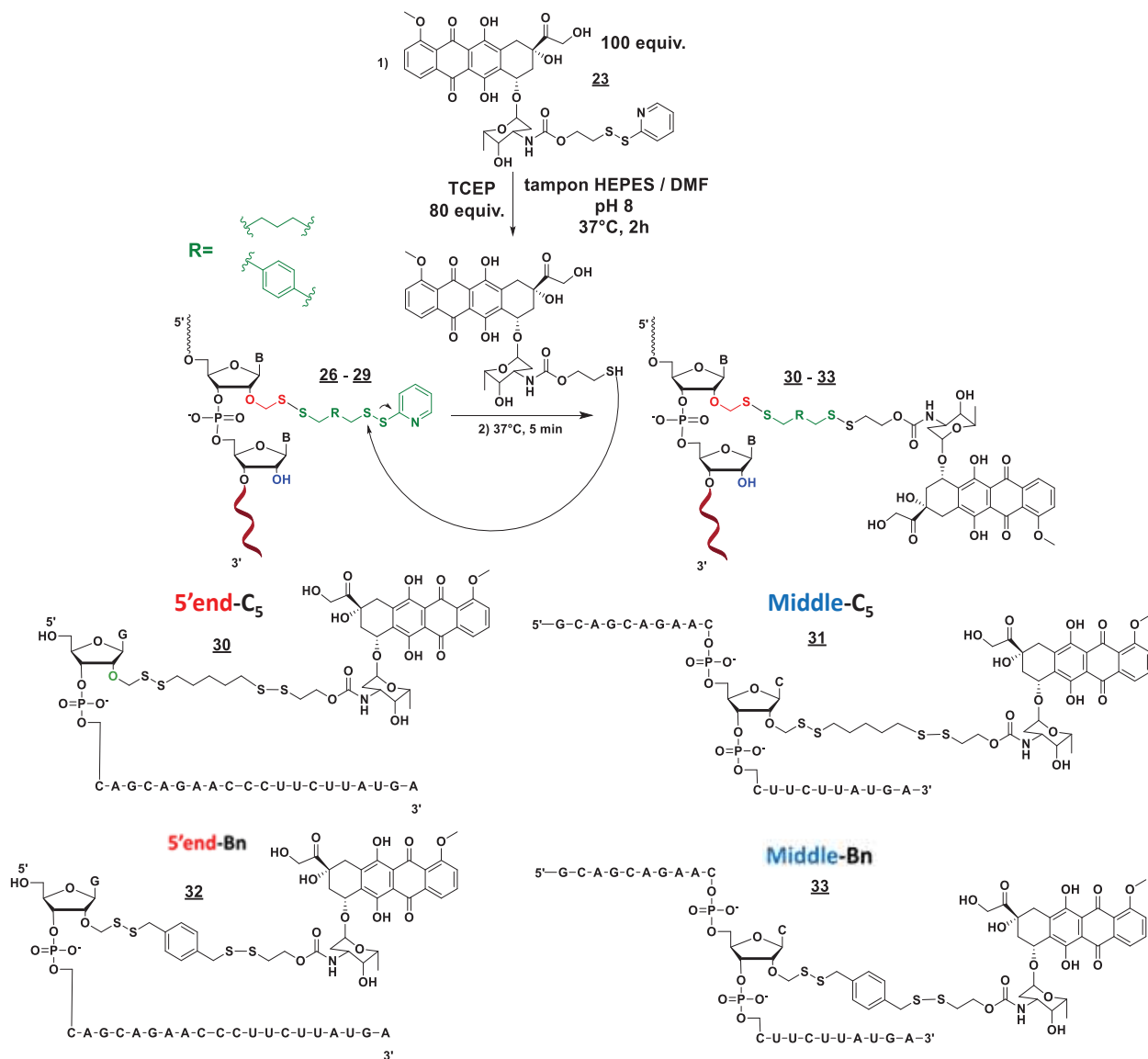


Schéma 50 : Synthèse et structure des ARNs **30** à **33**

- La première étape est la formation du thiol du dérivé de la doxorubicine **23** par rupture du lien disulfure. La réaction est effectuée en 2 h à 37 °C avec 100 équivalents de réactif **23** à 5 mM et 80 équivalents de TCEP à 50 mM dans un mélange de tampon HEPES à pH 8 (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,05 mM EDTA, 7,5 mM HEPES) et de DMF dans des proportions égales.²⁰⁴

La quantité inférieure de TCEP (80 équiv.) par rapport à la doxorubicine modifiée **23** (100 équiv.) permet de s'assurer de la consommation totale de l'agent réducteur après 2 h, évitant ainsi la rupture des ponts disulfures des ARNs lors de leur addition au milieu réactionnel. Le pH fixé à 8 permet de garantir la stabilité chimique de l'ARN. L'addition

de DMF permet de solubiliser complètement la doxorubicine, qui est peu soluble en milieu purement aqueux.

- La deuxième étape est la réaction d'échange thiol-disulfure par attaque du thiol fraîchement généré sur le pont disulfure activé des ARNs **26** à **29**. Le mélange contenant la doxorubicine sous forme thiol est directement ajouté sur l'ARN lyophilisé. La réaction est ensuite effectuée sous agitation pendant seulement 5 min à 37 °C. En effet, une réaction plus longue pourrait favoriser le réarrangement du lien par attaque d'un thiol libre sur les ponts disulfures liant l'ARN à la doxorubicine, engendrant la formation d'ARN 2'-OH.

La réaction a été arrêtée par addition de tampon HEPES à pH 5 favorisant la forme thiol moins réactive. Les composés ont ensuite été directement analysés (**Figure 37**) et purifiés par HPLC phase inverse puis caractérisés par IEX-HPLC et spectrométrie de masse MALDI-TOF (**Figure 38, Tableau 10**). L'analyse et la purification par HPLC phase inverse ont été choisies pour une meilleure séparation des ARNs **30** à **33** du reste des espèces en raison de la forte lipophilie apportée par la présence de la doxorubicine.

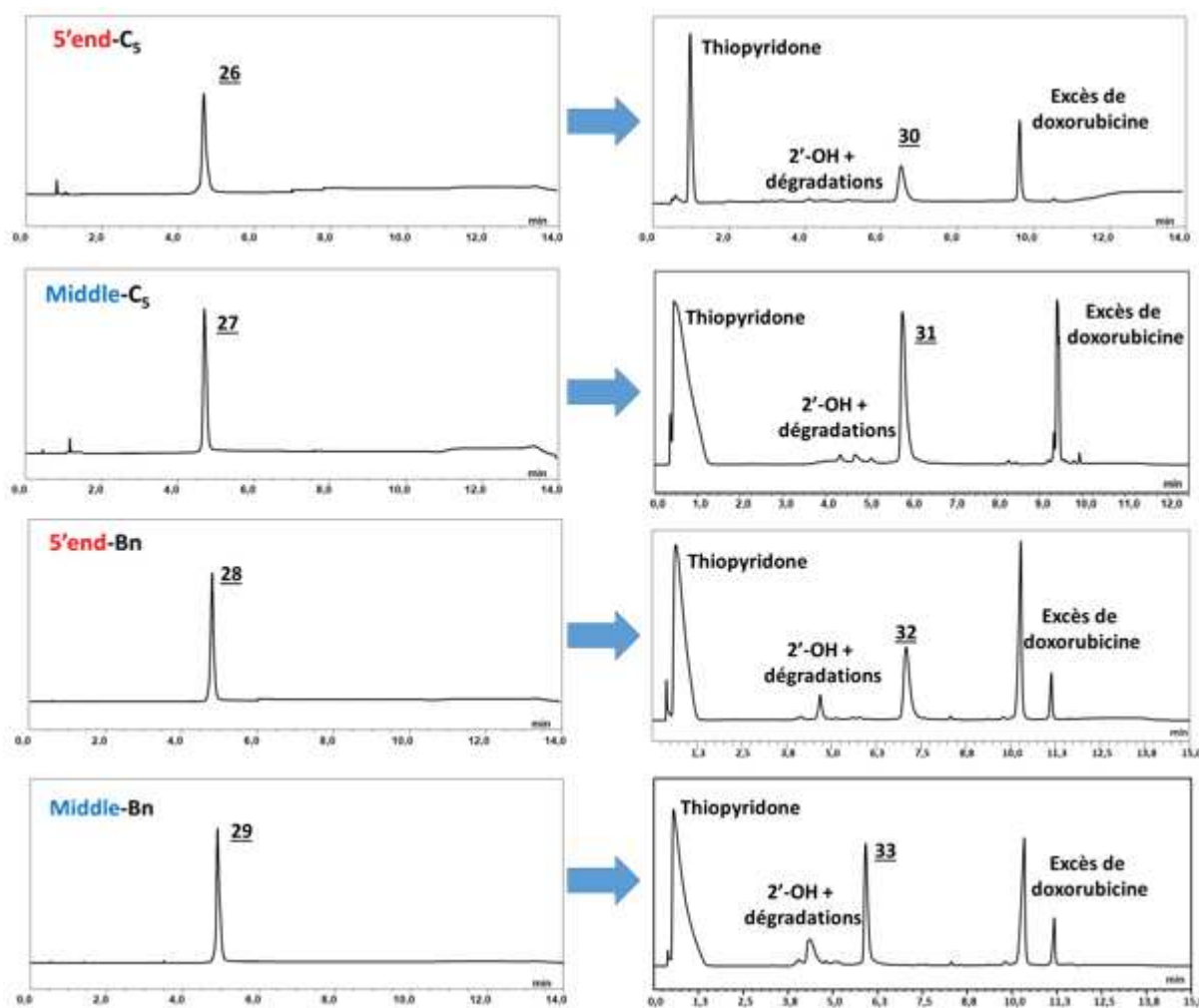


Figure 37 : Chromatogrammes HPLC phase inverse des bruts de couplages des ARNs couplés **30** à **33** à partir des ARNs **26** à **29**

Les chromatogrammes HPLC phase inverse montrent la présence de plusieurs pics (**Figure 37**). Le premier pic, avec un temps de rétention d'environ 1 min, correspond à la thiopyridone libérée en grande quantité par la préparation du thiol de la doxorubicine. Les pics avec des temps de rétention supérieurs à 10 min sont issus de l'excès de doxorubicine utilisée, sous des formes différentes pouvant correspondre à la forme pyridine, à la forme thiol, à la forme déprotégée ou à des dimères de doxorubicine.

N°	Lien	m/z calculée	m/z obtenue ^a	Taux de conjugaison (%) ^b	Rendement de couplage (%) ^c
30	5'end-C₅	7482,1	7482,8	91%	39%
31	Middle-C₅	7482,1	7484,0	80%	46%
32	5'end-Bn	7517,1	7516,5	80%	49%
33	Middle-Bn	7517,1	7515,3	69%	43%

Tableau 10 : Résultats et caractérisations des ARNs **30** à **33**

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ([M-H])

^bPourcentage du pic d'intérêt en aire relative des pics correspondants à des ARNs sur les chromatogrammes HPLC phase inverse du brut de réaction à 260 nm

^cRendement calculé à partir des quantités de produit pur déterminées par spectrophotométrie à 481 nm

Les pics avec des temps de rétention compris entre 4 et 5 min et présents en faibles quantités correspondent à l'ARN 2'-OH, issu de la coupure du lien auto-immolable, et à des produits de dégradations. Les pics avec des temps de rétention de 6 à 7 min sont attribués aux ARNs **30** à **33**. La détection de ces ARNs conjugués est confirmée par le suivi du chromatogramme à 481 nm, une des longueurs d'onde d'absorbance de la doxorubicine (coefficient d'extinction molaire en tampon $\epsilon_{481} = 10410 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Cette longueur d'onde est régulièrement utilisée pour doser les quantités de doxorubicine par spectrophotométrie.²⁰⁵

Les taux de conjugaison obtenus ont été calculés à partir du chromatogramme HPLC phase inverse en prenant uniquement en compte les pics correspondant aux ARNs, c'est-à-dire les espèces 2'-OH, les dégradations et les produits voulus, et en laissant de côté les pics de la thiopyridone et de la doxorubicine. Ces taux de conjugaison sont compris entre 69% et 91%, indiquant que cette réaction est efficace, avec consommation très rapide des ARNs précurseurs (**Tableau 10**). Les ARNs **30** et **31**, avec le lien pentyle, ont été obtenus avec des rendements légèrement plus élevés, respectivement 91% et 80%, que les ARNs **32** et **33**, avec le lien diméthylbenzène, qui ont été formés avec des rendements respectifs de 80% et 69%. Une hypothèse est que la flexibilité du lien pentyle facilite la réactivité avec la doxorubicine.

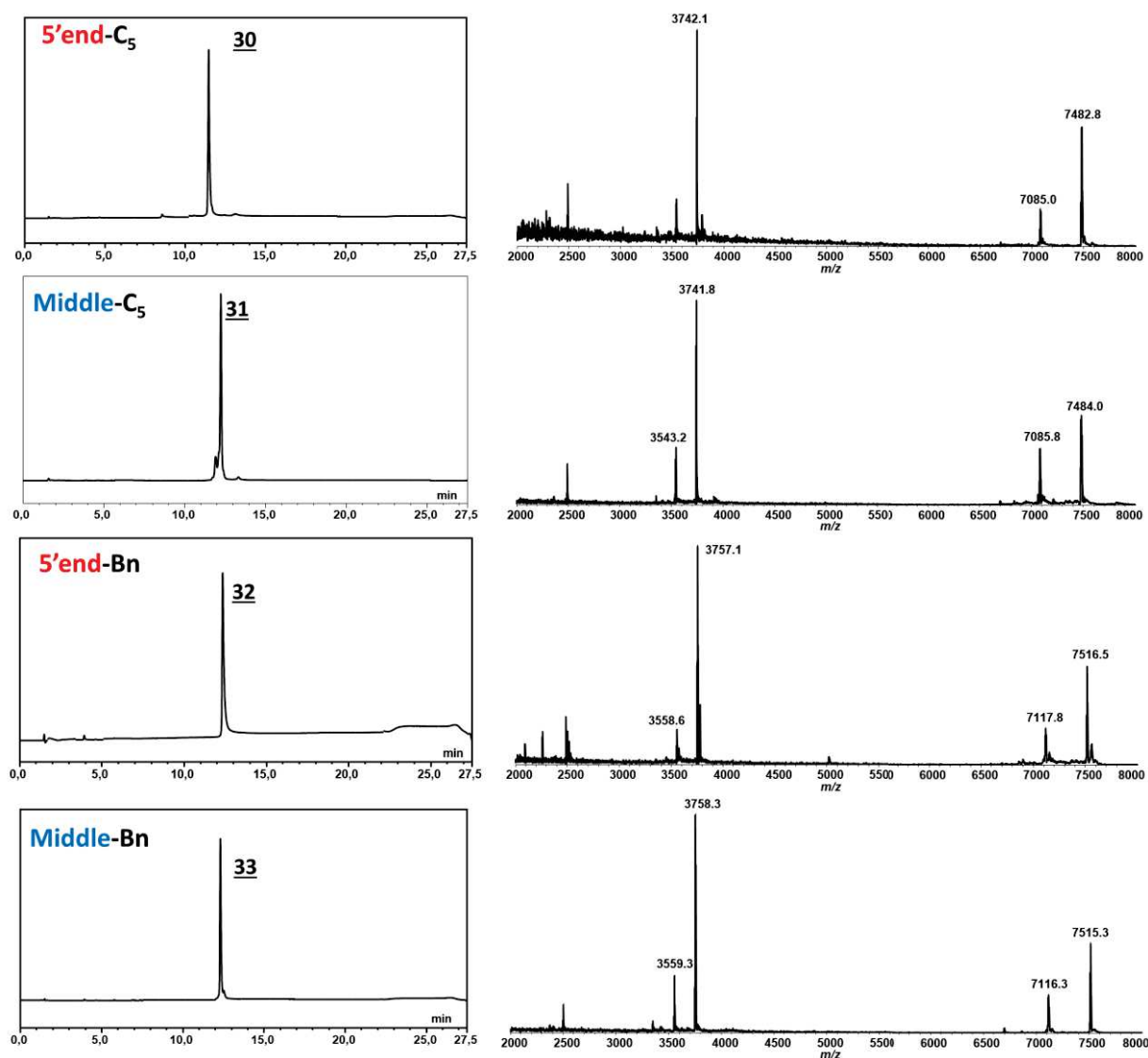


Figure 38 : Chromatogrammes IEX - HPLC et spectres de masse MALDI - TOF des ARNs couplés avec la doxorubicine purs 30 à 33

Les ARNs ont été analysés par IEX-HPLC après purification et caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (**Figure 38**). Les rendements de couplage calculés après purification sont similaires pour ces quatre ARNs, compris entre 39% et 49%, indiquant la flexibilité de la méthode, quelle que soit la nature du lien et la position de la doxorubicine. La détermination de ces rendements a été effectuée par dosage spectrophotométrique à 481 nm. En effet, la doxorubicine absorbe également à 260 nm, perturbant la mesure classique de l'absorbance des nucléotides. Une diminution d'environ 50% entre le taux de conjugaison et le rendement en produit isolé est observée, explicable par des pertes durant la purification en phase inverse. Néanmoins, les quantités obtenues restent suffisantes pour effectuer les différentes évaluations de ces conjugués.

Les spectres de masses montrent systématiquement deux pics de masse supérieure à 7000 Da, l'un correspondant à l'ARN conjugué (7482,1 Da pour 30 et 31, 7517,1 Da pour 32 et

33) et l'autre dont la masse est inférieure d'environ 398 Da (7085 Da pour **30** et **31**, 7117 Da pour **32** et **33**), correspondant à la coupure de la liaison glycosidique de la doxorubicine par fragmentation lors du processus d'ionisation dans le spectromètre (**Schéma 51**).²⁰⁶

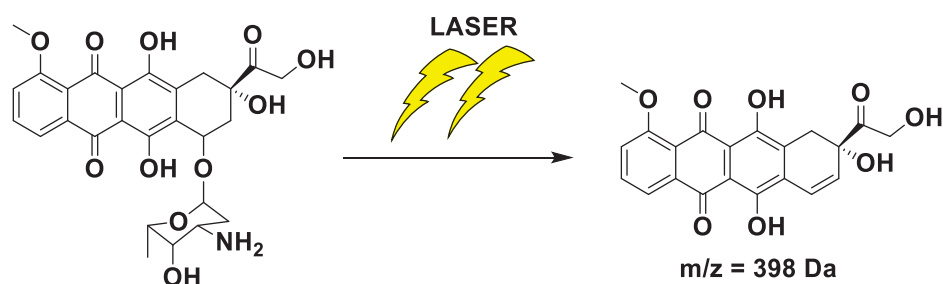


Schéma 51 : Fragmentation de la doxorubicine lors du processus d'ionisation

4.2.2. ARN conjugué à deux molécules de doxorubicine

L'introduction de deux molécules de doxorubicine sur un siARN serait utile pour augmenter l'activité biologique du conjugué. De plus, il nous est apparu intéressant de vérifier la flexibilité de notre méthode pour introduire plusieurs biomolécules par des liens auto-immolables. Ainsi, un ARN comportant les liens diméthylbenzènes sur les positions **5'end** et **Middle** a été synthétisé. Le lien diméthylbenzène a été sélectionné en raison de la disponibilité du précurseur **25**.

4.2.2.1. Synthèse d'un ARN modifié en deux positions par des liens 2'-O-PySSMBnSSM

Le brin sens du siARN du sarcome d'Ewing modifié par deux groupements 2'-O-PySSMBnSSM **34** (**Tableau 11**) a été obtenu en suivant un protocole similaire à celui utilisé pour la synthèse des ARNs **26** à **29**. Dans un premier temps, l'ARN a été assemblé sur support solide pour obtenir l'ARN supporté portant deux modifications 2'-O-AcSM.

N°		m/z calculée	m/z obtenue ^a	ARN d'intérêt ^b (%)	Quantités isolées ^c (nmol)
34	5' G 2'-O-PySSMBnSSM CA GCA GAA CC2'-O-PySSMBnSSM C UUC UUA UGA ^{3'}	7296,2	7294,3	15%	29,2

Tableau 11 : Caractérisation de l'ARN **34**

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ($[M-H]$)

^bPourcentage du pic de l'ARN d'intérêt en aire relative du chromatogramme IEX- HPLC du brut à 260 nm

^cQuantités isolées après purification mesurées par spectrophotométrie à 260 nm à partir d'une synthèse à l'échelle de 1 μ mol

La transformation des groupes thioacétyles (SAc) en lien PySSMBnSSM a ensuite été réalisée sur support avec 500 équivalents de réactif **25**, soit 250 équivalents par modification, dans un mélange THF / BuNH₂ (3:1, v/v) pendant 15 min. En effet, la limite de solubilité du réactif **25** empêche de réaliser la réaction à 500 équivalents par modification comme précédemment. La coupure de l'ARN du support solide et la déprotection des nucléobases et

des positions 2'OH a ensuite été effectuée avec une solution d'ammoniaque pendant 3 h pour obtenir l'ARN **34**.

L'analyse par IEX-HPLC montre l'ARN brut **34** présent dans des proportions de 15%, résultant certainement du plus faible nombre d'équivalents de réactif **25** utilisé. De plus, un large massif de pics apparaît sur le chromatogramme HPLC, indiquant un mélange important de dimères interbrins (**Figure 39**), en raison de la présence des deux modifications. Après purification par IEX-HPLC, 29,2 nmol de l'ARN **34** pur ont été isolées (**Tableau 11**). De nombreux pics sont visibles sur le spectre de masse, correspondant à la rupture partielle de façon aléatoire de plusieurs des quatre ponts disulfures présents sur l'ARN portant deux liens PySSMBnSSM. Ces coupures des ponts disulfures provoquées par le laser sont caractérisées par des pics séparés de 110 Da (7185,9 Da et 7075,6 Da) correspondant à la perte d'une thiopyridine, et d'autres séparés de 168 correspondant à la perte de l'entité 1,4-benzènediméthanethiol (6908,0 Da). La coupure complète des quatre ponts disulfures est également visible sur le spectre de masse de l'ARN non purifié (6746,1 Da).

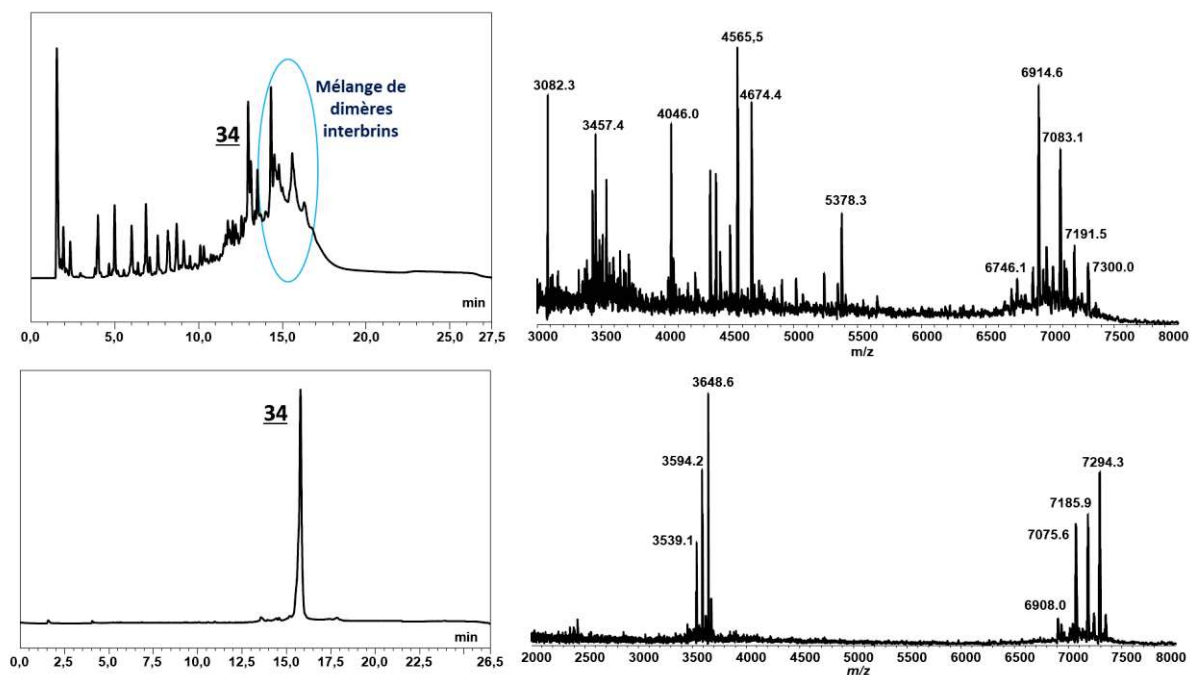


Figure 39 : Chromatogrammes HPLC et spectres de masse MALDI-TOF du brut de déprotection (en haut) et de l'ARN pur **34** (en bas)

4.2.2.2. Conjugaison en solution de l'ARN aux deux molécules de doxorubicine

Le couplage a été effectué dans les mêmes conditions que précédemment (2 h à 37°C et 80 équivalents de TCEP) mais 100 équivalents de doxorubicine modifiée **23**, soit seulement 50 équivalents par modification, ont été utilisés afin d'éviter des problèmes de solubilité de la doxorubicine. Ce mélange est ensuite ajouté à l'ARN **34** lyophilisé pendant 5 min dans un mélange tampon HEPES pH 8 / DMF (1:1, v/v). Le brut de couplage a été analysé par HPLC phase inverse (**Figure 40**). Un taux de conjugaison de 62% a été obtenu et un rendement global

de 26% a été déterminé après purification (**Tableau 12**). Cet écart est globalement similaire à celui observé après la purification des ARNs couplés à une seule doxorubicine.

Conjugaison avec l'ARN 34 : 5' G 2'-O-PySSMBnSSMCA GCA GAA CC2'-O-PySSMBnSSMC UUC UUA UGA 3'				
N°	m/z calculée	m/z obtenue ^a	Taux de conjugaison (%) ^b	Rendement de couplage (%) ^c
35	8375,1	8375,3	62%	26%

Tableau 12 : Synthèse de l'ARN conjugué **35** portant deux doxorubicines

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ([M-H])

^bPourcentage du pic d'intérêt en aire relative des pics correspondants à des ARNs sur le chromatogrammes HPLC phase inverse du brut de réaction à 260 nm

^cRendement global calculé à partir des quantités de produit pur déterminées par spectrophotométrie à 481 nm

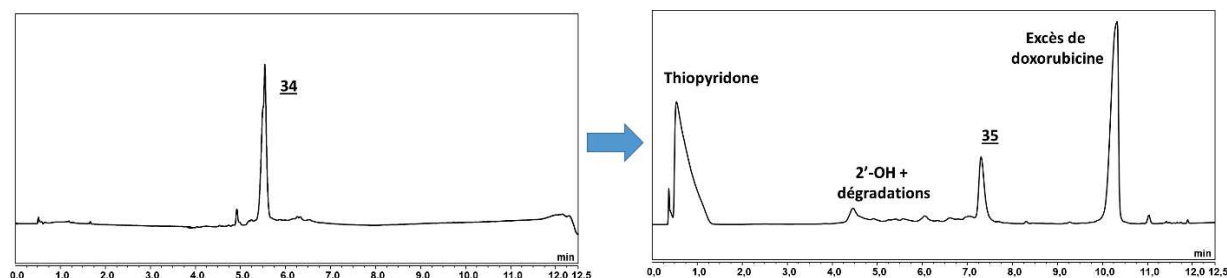


Figure 40 : Chromatogramme HPLC phase inverse du brut de couplage de l'ARN **35** à partir de l'ARN **34**

Le produit pur a ensuite été analysé par IEX-HPLC et caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (**Figure 41**). Les mêmes coupures de la doxorubicine observées précédemment sur le spectre de masse apparaissent, avec un pic à 7584,9 Da correspondant à la coupure des deux doxorubicines et un à 7980,2 Da correspondant à une seule coupure. L'obtention de 8 nmol d'ARN **35** conjugué à deux molécules de doxorubicine démontre l'application de la méthode pour la multi-conjugaison de molécules actives au travers de ponts disulfures. Cependant, son efficacité mériterait d'être améliorée en optimisant les conditions de couplage.

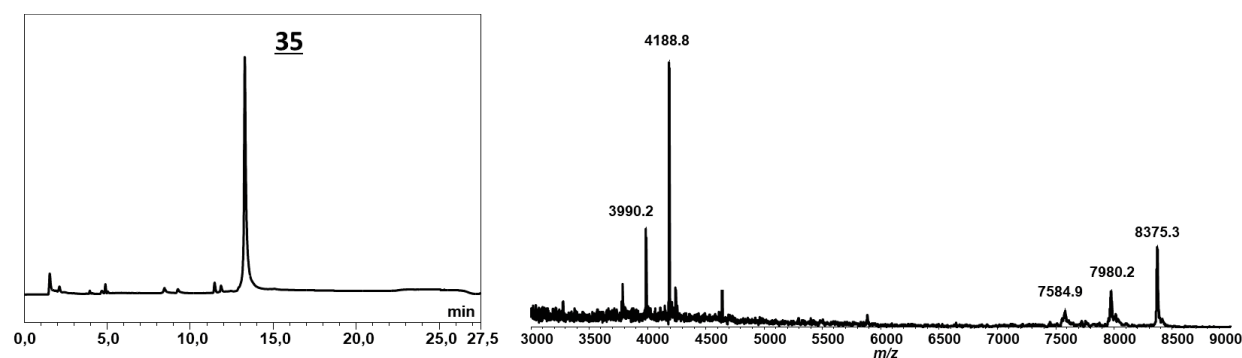


Figure 41 : Chromatogramme IEX-HPLC et spectre de masse MALDI-TOF de l'ARN pur **35**

4.3. Evaluation des siARNs conjugués à la doxorubicine

Les cinq ARNs conjugués à la doxorubicine **30**, **31**, **32**, **33** et **35** ont été combinés avec le brin antisens non modifié **2** pour former cinq siARNs (**30 / 2**, **31 / 2**, **32 / 2**, **33 / 2** et **35 / 2**) du sarcome d'Ewing. Il nous a paru important de déterminer si la doxorubicine liée de façon covalente ne perturbait pas trop la stabilité et la structure des duplex, gage de leur efficacité pour l'interférence ARN. La stabilité enzymatique des conjugués en sérum a également été vérifiée. Enfin, le caractère auto-immolable du lien des conjugués a été évalué en présence de glutathion.

4.3.1. Stabilité thermique des siARNs conjugués à la doxorubicine

Des expériences de dénaturation thermique ont été effectuées par spectrophotométrie UV à 260 nm en prenant comme modèles les siARNs **32 / 2** et **33 / 2** avec le lien diméthylbenzène entre les deux ponts disulfures. Les valeurs de T_m obtenues ont été comparées à celle du duplex non modifié **1 / 2** (**Tableau 13**). Au cours de leur fusion et de leur hybridation, les deux siARNs conjugués présentent une courbe sigmoïdale marquée par une transition nette indiquant que la doxorubicine n'empêche pas l'hybridation (**Figure 42**).

siARN	T_m (°C) ^a	ΔT_m (°C) ^b
1 / 2	75,6	-
32 (5'end-Bn) / 2	73,4	-2,2
33 (Middle-Bn) / 2	72,9	-2,7

Tableau 13 : Valeurs de T_m des siARNs formés des ARNs **32** et **33** conjugués à la doxorubicine et du brin antisens **2** non modifié

^aValeur de T_m obtenue par spectrophotométrie UV à 260 nm. $C_{ARN} = 1,5 \mu M$, tampon = cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM pH 7. La valeur obtenue correspond à la moyenne de 2 cycles dénaturation / hybridation (gradient entre 0 °C et 90 °C). Erreur estimée : $T_m = \pm 0,5$ °C

^b ΔT_m = Différence entre la valeur de T_m du duplex et la valeur de T_m du duplex **1 / 2** non modifié

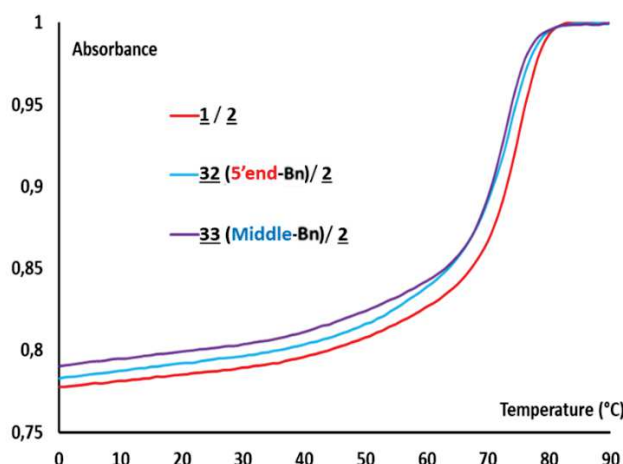


Figure 42 : Courbes de dénaturation thermique des siARNs conjugués à la doxorubicine

Une légère déstabilisation des duplex modifiés est observée avec des valeurs de ΔT_m de $-2,2$ °C pour le duplex 32 / 2 et de $-2,7$ °C pour le duplex 33 / 2. Aucune différence de stabilité des siARNs conjugués n'est à noter selon la position de la conjugaison sur la séquence. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il n'y a pas d'intercalation de la doxorubicine entre les paires de bases. Les valeurs de T_m sont supérieures à 60 °C, confirmant la stabilité thermique des siARNs à température physiologique et la possibilité de les utiliser pour des études en milieu biologique.

4.3.2. *Etude de la conformation par dichroïsme circulaire*

Les empreintes spectrales des cinq siARNs conjugués à la doxorubicine ont été déterminées par dichroïsme circulaire, pour vérifier si la présence de la drogue induit une modification de la structure de l'hélice. Nous les avons donc comparés au duplex 1 / 2 non modifié dont le spectre possède une bande positive intense autour de 265 nm et une bande négative intense autour de 210 nm.

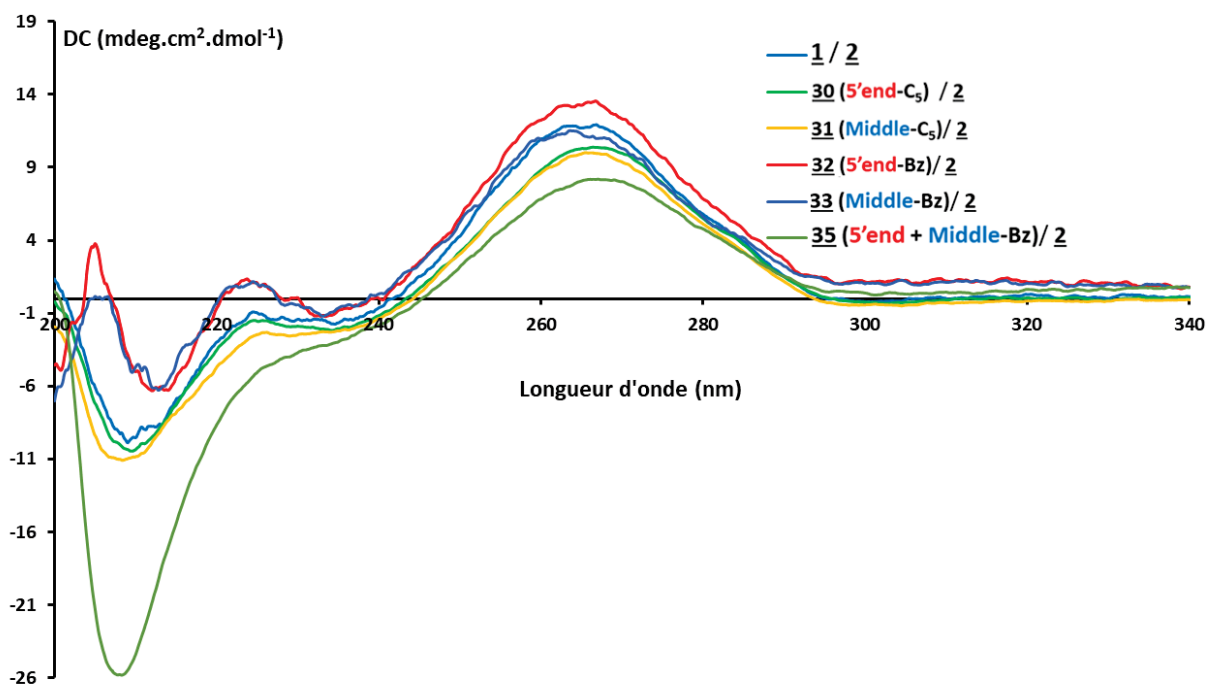


Figure 43 : Spectres de dichroïsme circulaire des siARNs conjugués à la doxorubicine en comparaison avec le duplex non modifié 1 / 2

$C_{ARN} = 1,5 \mu M$, tampon = cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM pH 7. Moyennes de 2 mesures. Température d'analyse : 1 °C

A la vue des empreintes spectrales obtenues (**Figure 43**), la forme d'hélice A de l'ARN est globalement conservée pour l'ensemble des duplex. Les deux duplex avec une doxorubicine liée par le lien diméthylbenzène (32 / 2 et 33 / 2) montrent des spectres dichroïques similaires à celui du duplex non modifié 1 / 2. En revanche, une diminution d'environ 25% de l'intensité de la bande à 265 nm est observée pour les siARNs avec le lien

aliphatique (**30 / 2** et **31 / 2**), traduisant une variation de l'empilement des bases du duplex. Des variations plus importantes du spectre dichroïque du duplex portant deux doxorubicines (**35 / 2**) sont observées, avec une diminution d'environ 40% de l'intensité de la bande positive à 265 nm et une augmentation de plus de 200% de l'intensité de la bande négative autour de 210 nm. Cette observation indique des déformations plus importantes du siARN, induites par la conjugaison à deux doxorubicines.

4.3.3. *Etude de la stabilité en présence de sérum humain*

Pour évaluer leur stabilité enzymatique, les siARNs conjugués à la doxorubicine ont été incubés en présence de 10% de sérum humain pendant 8 h à 37 °C afin de mimer les conditions enzymatiques extracellulaires. Les différentes analyses ont été effectuées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, à différents temps d'incubation. Pour chaque expérience, une référence avec le duplex incubé en l'absence de sérum a été déposée sur le gel pour évaluer la stabilité chimique des conjugués ARN-doxorubicine (**Figure 44**). Les demi-vies sont compilées dans le **Tableau 14**.

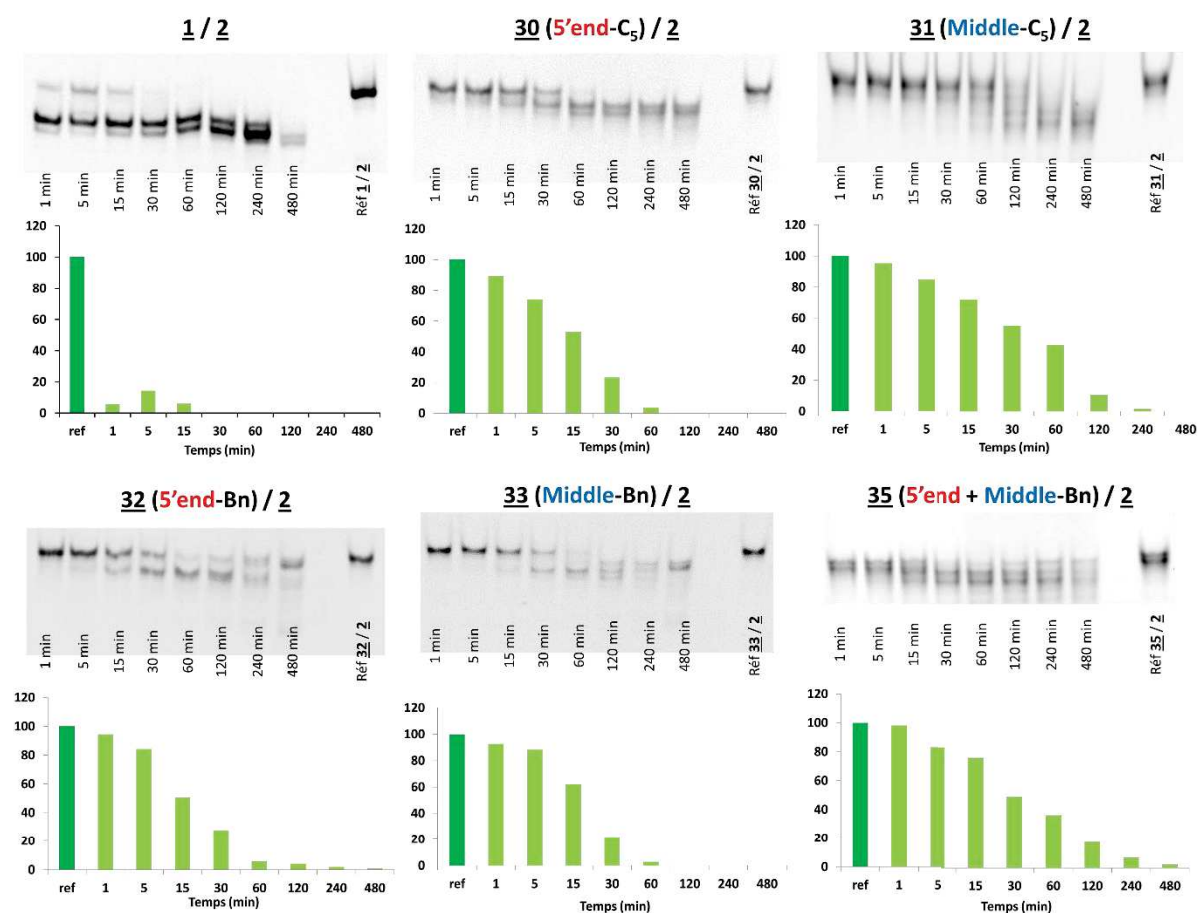


Figure 44 : Gels d'électrophorèse et suivi de la dégradation en sérum humain des siARNs conjugués à la doxorubicine

Une faible augmentation de la stabilité est observée pour les siARNs **30 / 2**, **32 / 2** et **33 / 2**, avec des demi-vies comprises entre 10 et 20 minutes, soit une stabilité au minimum

doublée par rapport au duplex non modifié. En revanche, les deux siARNs **31** / **2** ($t_{1/2} = 38,2$ min), possédant le lien **Middle-C₅**, et **35** / **2** ($t_{1/2} = 47,6$ min) avec deux doxorubicines, ont des demi-vies environ dix fois supérieures à celle de l'ARN non modifié.

Lien	siARN	$t_{1/2}$ (min) Serum humain 10%
-	1 / 2	< 5
5'end-C₅	30 / 2	13,5
Middle-C₅	31 / 2	38,2
5'end-Bn	32 / 2	20,0
Middle-Bn	33 / 2	10,5
5'end + Middle-Bn	35 / 2	47,6

Tableau 14 : Demi-vies calculées pour les siARNs conjugués en présence de 10% de sérum humain
Calcul de la demi-vie sous l'hypothèse d'une cinétique enzymatique d'ordre 1 de la forme $y = Ae^{-kt}$ modélisée par Microsoft Excel. Coefficients de corrélation $0,90 \leq R^2 \leq 1,00$
Modélisation non effectuée pour les duplex trop rapidement dégradés par manque de points expérimentaux

4.4. Devenir des ARNs liés à la doxorubicine en milieu réducteur

L'intérêt de notre stratégie est d'obtenir des conjugués auto-immolables en milieu réducteur, libérant le siARN et la doxorubicine libres par coupure des ponts disulfures. Pour vérifier le caractère immolable des liens utilisés, nous avons mis un ARN conjugué à la doxorubicine (**32**) en présence d'un agent réducteur et nous avons suivi la libération des deux entités par HPLC phase inverse. Cette méthode a été préférée à l'analyse par IEX-HPLC car la doxorubicine modifiée **23** est séparée efficacement de la doxorubicine naturelle, en raison de leur différence de lipophilie (**Figure 45**). En effet, la doxorubicine modifiée possède un temps de rétention supérieur de 1,5 min, et la disparition de ce pic est donc un moyen efficace de suivre le départ du lien *N*-éthylcarbamate.

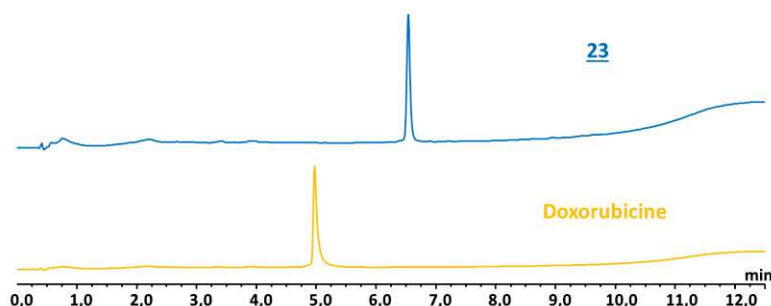


Figure 45 : Chromatogrammes HPLC phase inverse de la doxorubicine modifiée **23** et non modifiée

L'ARN **32** modifié par le lien **5'end-Bn** a été mis en présence d'un très large excès de TCEP dans du tampon à pH 8 puis le mélange a été incubé pendant 24 h avant analyse par

HPLC phase inverse. Trois références ont été utilisées pour suivre l'évolution : le brin sens non modifié 1, l'ARN 32 substrat de départ et la doxorubicine non modifiée (**Figure 46**).

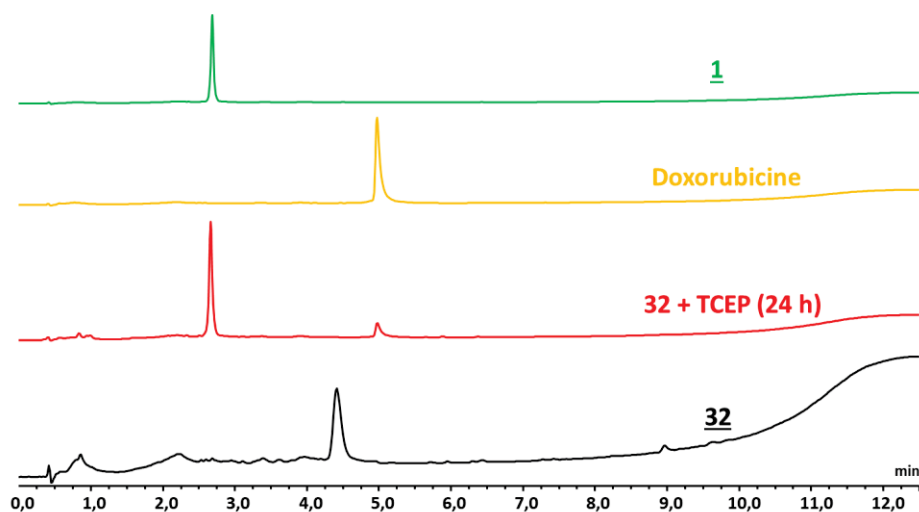


Figure 46 : Suivi de l'évolution de l'ARN 32 en présence de TCEP par HPLC phase inverse à 260 nm

Bien que le pic de la doxorubicine soit faible sur le chromatogramme enregistré à 260 nm en comparaison de celui correspondant à l'ARN, la récupération des deux espèces totalement démasquées est confirmée. Les temps de rétention des deux espèces récupérées après 24 h de traitement réducteur correspondent à ceux de leurs références respectives. En particulier pour la doxorubicine, le départ du lien auto-immolable est confirmé par l'absence de l'espèce modifiée.

Cette expérience confirme donc le caractère auto-immolable du lien que nous avons testé, et nous pouvons extrapoler ces résultats aux autres liens envisagés dans cette étude, étant donné la similarité de leurs structures.

5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons synthétisé des ARNs conjugués à la doxorubicine avec des liens covalents et auto-immolables, ce qui constitue une approche intéressante pour envisager de la co-délivrance de siARN et de drogue. Pour ce faire, nous avons mis au point une stratégie de synthèse de siARNs conjugués à la doxorubicine utilisant la chimie des ponts disulfures pour lier les deux partenaires par un lien auto-immolable sensible aux conditions réductrices. La doxorubicine a été préalablement modifiée pour introduire un lien 2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)-éthylcarbamate, choisi pour son caractère auto-immolable en milieu réducteur. L'ARN a été préparé par la méthode aux phosphoramidites par synthèse automatisée en incorporant un synthon 2'-O-AcSM phosphoramidite comme précurseur du lien pour la conjugaison.

Ensuite, une réaction supportée avec deux réactifs bis(disulfanyl)pyridine préalablement préparés a permis la synthèse de quatre ARNs portant une modification 2'-O-((5-(pyridin-2-yl)disulfanyl)pentyl)disulfanyl)méthyle (2'-O-PySSPSSM) ou 2'-O-((4-((pyridin-2-yl)disulfanyl)méthyl)benzyl)disulfanyl)méthyle (2'-O-PySSMBnSSM) soit à l'extrémité 5', soit au milieu de la séquence. L'optimisation des conditions de cette réaction a révélé qu'un large excès de réactifs est nécessaire pour favoriser l'obtention des ARNs souhaités. Un ARN portant la modification 2'-O-PySSMBnSSM sur les deux positions a également été synthétisé, démontrant la possibilité de multi-conjugaison.

Pour effectuer la conjugaison en solution, le pont disulfure activé de la doxorubicine, préalablement réduit par du TCEP, réagit sur les ARNs précurseurs 2'-O-PySSPSSM et 2'-O-PySSMBnSSM pour former le lien covalent par une réaction d'échange thiol-disulfure. Ces couplages, malgré un temps de réaction très court, s'effectuent avec une très bonne efficacité.

Les ARNs conjugués ont été hybridés à leur ARN complémentaire pour former des siARNs dont la stabilité thermique dans des conditions physiologiques a été vérifiée pour certains, malgré la présence de la doxorubicine, ainsi que la conservation de l'hélice A des siARNs. La stabilité enzymatique des conjugués en sérum humain a été légèrement augmentée par rapport au siARN naturel. Enfin, la libération simultanée du siARN et de la doxorubicine en milieu réducteur a validé notre stratégie d'utiliser un lien auto-immolable entre les deux molécules.

L'étape suivante de ce projet consistera à évaluer la capacité d'inhibition de ces siARNs conjugués en milieu cellulaire ainsi que la cytotoxicité pour quantifier l'effet de la doxorubicine dans les cellules, dans le cadre d'une stratégie de co-délivrance. Enfin, le suivi de la pénétration cellulaire sans agents de transfection montrera si la lipophilie de la doxorubicine est suffisante pour compenser la faible pénétration cellulaire des siARNs. Ces études biologiques seront réalisées par notre collaborateur, le Dr. Jean-Rémi Bertrand.

6. Partie expérimentale

General experimental procedures

Analytical and semi-preparative ion-exchange high performance liquid chromatography were performed on a Thermo Ultimate 3000 HPLC system equipped with anion-exchange DNAPac PA 100 columns (4 x 250 mm for analysis or 9 x 250 mm for semi-preparative purpose, Dionex), UV detection at 260 nm. The following HPLC solvent systems were used: 5% CH₃CN in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8 (buffer A) and 5% CH₃CN containing 400 mM NaClO₄ in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8 (buffer B). Flow rates were 1.0 mL.min⁻¹ and 4 mL.min⁻¹ for analysis and semi-preparative purposes, respectively.

Analytical and semi-preparative RP-HPLC high performance liquid chromatographies were performed on a Thermo Ultimate 3000 HPLC system equipped with (ThermoFisher Scientific LC Accucore™ C18, 100 Å, 2.1 x 50 mm, Buffer A: 12.5 mM TEAAc in 1% CH₃CN, Buffer B: 12.5 mM TEEAc in 80% CH₃CN, 1 mL / min flow rate, detection at 260 nm).

All the others general experimental procedures are the same as described in the experimental section of chapter I.

Synthesis of 2'-O-AcSM-5'-O-DMTr-3'-O-phosphoramidites nucleosides **10a-c**

The synthesis of the cytidine **10a**, the adenosine **10b** and the guanosine **10c** 2'-O-AcSM phosphoramidites are described in the experimental section of chapter I.

Synthesis of 2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol **21**

2, 2' dithiodipyridine (2.66 g, 12.1 mmol, 1.50 equiv) was dissolved under argon in dry MeOH (100 mL). The solution was treated dropwise with a solution of 2-mercaptoethanol (1.00 g, 8.10 mmol, 1.00 equiv) in dry MeOH (16.0 mL). Completion was achieved in 1 h and the solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by silica gel column chromatography with a step gradient of cyclohexane and EtOAc (10-20%). The desired compound **21** was obtained as colorless oil (910 mg, 6.16 mmol, 76%). ¹H NMR (DMSO-D₆, 400 MHz): δ(ppm) = 8.54 (d, *J* = 4.9 Hz, 1 H, H_{aro}) ; 7.60 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.7 Hz, 1 H, H_{aro}) ; 7.66 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1 H, H_{aro}) ; 7.20 – 7.15 (m, 1 H, H_{aro}) ; 5.20 (s, 1 H, OH) ; 3.81 (t, *J* = 5.2 Hz, 2 H, CH₂) ; 2.97 (t, *J* = 5.2 Hz, 2 H, CH₂).

Synthesis of 4-Nitrophenyl 2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl carbonate **22**

DIEA (158 μL, 0.79 mmol, 1.50 equiv) was added to a solution of **21** (100 mg, 0.53 mmol, 1.00 equiv), and bis(4-nitrophenyl) carbonate (241 mg, 0.79 mmol, 1.50 equiv) in CH₂Cl₂ (2 mL) under Ar, and stirred for 5 h. The mixture was washed with water, and the organic phase was extracted with brine and dried with MgSO₄. The solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by successive silica gel column chromatographies with a step gradient of DCM and MeOH (0-1%). The desired compound **22** was obtained as white powder

(70 mg, 0.19 mmol, 36%). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):** δ(ppm) = 8.54 (d, *J* = 4.7 Hz, 1 H, H_{aro}) ; 8.27 (d, *J* = 9.3 Hz, 2 H, H_{aro}) ; 7.72 – 7.71 (m, 2 H, H_{aro}) ; 7.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H, H_{aro}) ; 7.20 – 7.17 (m, 1 H, H_{aro}) ; 4.57 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H, CH₂) ; 3.19 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H, CH₂).

Synthesis of 2-(pyridin-2-ylidisulfanyl)ethylcarbamate doxorubicin **23**

DIEA (80 μL, 0.28 mmol, 1.4 equiv) was added under argon to a solution of **22** carbonate (100 mg, 0.28 mmol, 1.4 equiv) and doxorubicin hydrochloride (120 mg, 0.20 mmol, 1 equiv) in DMF (10 mL). The reaction was stirred at room temperature overnight, then the solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by flash chromatography with a step gradient of DCM and MeOH (2-5%). The desired compound **23** was obtained as red solid (141 mg, 0.19 mmol, 93%). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):** δ(ppm) = 13.96 (s, 1 H, OH) ; 13.21 (s, 1 H, OH) ; 8.40 (d, *J* = 3.7 Hz, 1 H, H_{aro}) ; 8.01 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H_{aro}) ; 7.80-7.61 (m, 3 H, H_{aro}) ; 7.38 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H, H_{aro}) ; 7.08 (t, *J* = 5.4 Hz, 1 H, H_{aro}) ; 5.51 (s, 1 H, OH) ; 5.28 (m, 2 H, NH + OH) ; 5.10 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, O-CH-O) ; 4.74 (d, *J* = 4.4 Hz, 2 H, CH₂-OH) ; 4.56 (s, 1 H, CH₂-OH) ; 4.42 – 4.38 (m, 1 H, CH-O) ; 4.21 – 4.09 (m, 2 H, CH₂) ; 4.07 (s, 3 H, OCH₃) ; 3.86 - 3.77 (m, 1 H, CH) ; 3.62 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, CH-OH) ; 3.25 (d, *J* = 18.8 Hz, 1 H, CH-NH) ; 3.08 – 2.87 (m, 5 H, 2 CH₂, 1 CH) ; 2.34 (d, *J* = 14.6 Hz, 1 H, CH) ; 2.15 (dd, *J* = 14.6 Hz, *J* = 3.7 Hz, 1 H, CH) ; 1.81 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, CH₃). **¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz):** 212.8 (C=O) ; 185.9 (C=O) ; 185.5 (C=O) ; 160.0 (C-OMe) ; 159.0 (N=C-S) ; 155.2 (NCOO) ; 154.5 (C-OH) ; 154.2 (C-OH) ; 148.4 (C_{Ar}) ; 136.3 (C_{Ar}) ; 134.7 (C_{Ar}) ; 134.4 (C_{Ar}) ; 132.6 (C_{Ar}) ; 132.5 (C_{Ar}) ; 119.8 (C_{Ar}) ; 119.7 (C_{Ar}) ; 118.9 (C_{Ar}) ; 118.8 (C_{Ar}) ; 117.4 (C_{Ar}) ; 110.5 (C_{Ar}) ; 110.3 (C_{Ar}) ; 99.9 (O-C-O) ; 68.7 (C-O) ; 68.0 (C-O) ; 66.4 (C-O) ; 64.5 (C-O) ; 62.4 (C-O) ; 55.6 (O-Me) ; 46.0 (S-CH₂-CH₂-O) ; 36.5 (C-NH) ; 34.6 (CH₂) ; 32.9 (CH₂) ; 29.0 (CH₂) ; 28.7 (CH₂) ; 15.9 (C-Me). **HRMS (ESI⁺):** *m/z* calcd for C₃₅H₃₇N₂O₁₃S₂ [M + H]⁺ 757.1737, Found 757.1740.

Synthesis of 1,5-bis(pyridin-2-ylidisulfanyl)pentane **24**

A solution of benzenedimethanethiol (2.50 g, 18.4 mmol, 1.0 equiv) in dry MeOH (50 mL) was added dropwise under argon to a stirred solution of 2,2'-dithiodipyridine (12.0 g, 55.1 mmol, 3.00 equiv) in dry MeOH (200 mL). The yellow mixture was stirred at room temperature for 1.5 h to reach completion. The solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by silica gel column chromatography with a step gradient of DCM and EtOAc (2-5%) followed, after evaporation of the compound, by a RP column chromatography with a gradient of water and acetonitrile (0 - 60%). The desired compound **24** was obtained as colorless oil (2.01 g, 5.70 mmol, 31%). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):** δ(ppm) = 8.45 (d, *J* = 4.2 Hz, 2 H, H_{pyridyl}) ; 7.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H, H_{pyridyl}) ; 7.64 (td, *J* = 7.3 Hz, *J* = 1.7 Hz, 2 H, H_{pyridyl}) ; 7.08 (ddd, *J* = 7.1 Hz, *J* = 4.9 Hz, *J* = 1.0 Hz, 2 H, H_{pyridyl}) ; 2.77 (t, *J* = 7.2 Hz, 4 H, 2 CH₂) ; 1.69 (p, *J* = 7.4 Hz, 4 H, 2 CH₂) ; 1.53 - 1.46 (m, 2 H, 1 CH₂). **¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz):** 159.4 (2 C_{pyridyl}) ; 148.3 (2 C_{pyridyl}) ; 136.2 (2 C_{pyridyl}) ; 119.6 (2 C_{pyridyl}) ; 118.9 (2 C_{pyridyl}) ; 37.7 (2 CH₂) ; 27.4 (2 CH₂) ; 26.2 (CH₂). **HRMS (ESI⁺):** *m/z* calcd for C₁₅H₁₉N₂S₄ [M + H]⁺ 355.0431, Found 355.0434.

Synthesis of 1,4-bis((pyridin-2-yl)disulfanyl)methyl)benzene 25

A solution of 1,4-benzenedimethanethiol (2.50 g, 14.6 mmol, 1.00 equiv) in dry MeOH (50 mL) was added dropwise to a stirred solution of 2,2'-dithiodipyridine (9.70 g, 44 mmol, 3.00 equiv) in dry MeOH (200 mL) under argon. The yellow mixture was stirred at room temperature for 2.5 h to reach completion. The solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by silica gel column chromatography with a step gradient of DCM and MeOH (0-10%). The desired compound 25 was obtained as pale yellow oil (2.1 g, 5.4 mmol, 37%). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):** δ(ppm)= 8.44 (d, *J* = 4.1 Hz, 2 H, H_{pyridyl}); 7.58 – 7.47 (m, 4 H, H_{pyridyl}); 7.19 (s, 4 H, H_{aro}); 7.05 (ddd, *J* = 7.0 Hz, *J* = 4.9 Hz, *J* = 1.1 Hz, 2 H, H_{aro}); 3.96 (s, 4 H, 2 CH₂). **¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz):** 159.8 (2 C_{pyridyl}); 149.3 (2 C_{pyridyl}); 137.0 (2 C_{aro}); 135.9 (2 C_{pyridyl}); 129.6 (4 C_{aro}); 120.7 (2 C_{pyridyl}); 119.6 (2 C_{pyridyl}); 53.5 (2 CH₂); 35.4 (CH₂). **HRMS (ESI⁺):** *m/z* calcd for C₁₈H₁₇N₂S₄ [M + H]⁺ 389.0275, Found 389.0274.

Solid-phase synthesis of RNA oligonucleotides

The solid-phase synthesis of RNA oligonucleotides was described in the experimental section of chapter I.

Synthesis of modified 2'-O- PySSPSSM oligoribonucleotides 26 and 27

After RNA elongation, the solid support was treated with 2 mL of a 0.4 M solution of 24 (500 equiv.) and a 2.5 M butylamine (0.5 mL) solution in anhydrous THF (1.5 mL). The solution was applied to the synthesis column using two glass syringes filled with 4 Å molecular sieves (5 beads each), and pushed back and forth through the synthesis column for 15 min. Then the solution was removed and the solid-support was washed with anhydrous THF followed by a 1 min flush with argon. Finally, the solid support was treated with a 30% aqueous ammonia solution for 3 h at 25°C. The solution was evaporated in the presence of isopropylamine (13% of total volume) under reduced pressure. The residue was dissolved in 1.5 mL water, transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized.

Synthesis of modified 2'-O- PySSMBnSSM oligoribonucleotides 28, 29 and 34

After RNA elongation, the solid support was treated with 2 mL of a 0.4 M solution of 25 (500 equiv.) and a 2.5 M butylamine (0.5 mL) solution in anhydrous THF (1.5 mL). The solution was applied to the synthesis column using two glass syringes filled with 4 Å molecular sieves (5 beads each), and pushed back and forth through the synthesis column for 15 min. Then the solution was removed and the solid-support was washed with anhydrous THF followed by a 1 min flush with argon. Finally, the solid support was treated with a 30% aqueous ammonia solution for 3 h at 25°C. The solution was evaporated in the presence of isopropylamine (13% of total volume) under reduced pressure. The residue was dissolved in 1.5 mL water, transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized.

Analysis, purification and desalting of RNAs 26, 27, 28, 29 and 34

The crude oligonucleotides were analyzed by IEX-HPLC and characterized by MALDI-TOF spectrometry. The crude oligonucleotides were then purified by semi-preparative IEX-HPLC. The pure fraction of each ON were pooled in a 100 mL round-bottomed flask and were concentrated to dryness under reduced pressure. The residues were dissolved in 100 mL TEAAc buffer, pH 7 and they were desalted using a C₁₈ cartridge (Sep-Pak®, Waters) equilibrated with a 100 mM TEAAc buffer solution. The desired compound was eluted with a 12.5 mM TEAAc / CH₃CN (1:1, v/v) solution in a 50 mL round-bottomed flask and was lyophilized. The residue was dissolved in 1.5 mL water (divided in 3 portions 0.8 mL, 0.4 mL and 0.3 mL for flask rinsing), transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized. Purified RNAs were characterized by MALDI-TOF MS and quantified by UV measurement.

Preparation of RNA conjugates 30, 31, 32, 33 and 35. A 10 mM solution of Doxorubicine 2-(pyridin-2-ylidisulfanyl)ethyl carbamate 23 was prepared in DMF. The solution (100 equiv) was diluted with an equal volume of HEPES buffer (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05 mM EDTA, 7.5 mM HEPES, pH 8) and a solution of TCEP (50 nmol / μL) (80 equiv). The mixture was stirred for 2 h at 37°C using a thermoshaker (Thermal Shake lite®). Then the solution was added to the freeze-dried RNAs 26, 27, 28, 29 or 34 in a 0.5 mL Eppendorf and stirred at 37°C for 5 min using a thermoshaker (Thermal Shake lite®). The reaction was stopped by addition of a large excess of HEPES buffer pH 5. The RNA conjugates were immediately purified by RP-HPLC, characterized by MALDI-TOF MS using the procedures described above.

IEX-HPLC analyses of modified oligonucleotides

N°	Gradient (% of B buffer) ^a	Retention time (min)
<u>26</u>	0 to 40 % in 20 min	12,4
<u>27</u>	0 to 40 % in 20 min	12,4
<u>28</u>	0 to 40 % in 20 min	12,5
<u>29</u>	0 to 40 % in 20 min	12,5
<u>30</u>	0 to 60 % in 20 min	12,6
<u>31</u>	0 to 60 % in 20 min	12,6
<u>32</u>	0 to 60 % in 20 min	12,8
<u>33</u>	0 to 60 % in 20 min	12,8
<u>34</u>	0 to 40 % in 20 min	15,4
<u>35</u>	0 to 60 % in 20 min	13,5

^aIEX-HPLC analysis : Dionex DNAPac Pa100, 4x250 mm, buffer A : 5% CH₃CN in 25 mM Tris HCl pH 8, Buffer B : 5% CH₃CN containing 400 mM NaClO₄ in 25 mM Tris HCl pH 8, flow rate : 1 mL / min, column temperature: 30 °C, detection at 260 nm

Thermal denaturation, CD spectroscopy and serum stability assays

The thermal denaturation, CD spectroscopy and serum stability procedures are described in the experimental section of chapter I.

Evaluation of RNA 32 in the presence of TCEP, a reducing agent

1 nmol of RNA 32 (10 μ L) was mixed with 90 μ L of HEPES buffer (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05 mM EDTA, 7.5 mM HEPES, pH 8) and 5 μ L of a 50 mM solution of TCEP in the same HEPES buffer. The mixture was incubated at 37 °C. After 24h, the sample was analysed by RP-HPLC. RNA references 1 and 32 were prepared in water. Doxorubicin and modified doxorubicin 23 were dissolved in DMF and diluted with buffer before RP-HPLC analyses. The solution of modified doxorubicin 23 was also treated for 5 min at 37 °C with a large excess of a 50 mM solution de TCEP to ensure the thiol formation before HPLC analysis.

Chapitre III : Conjugaison d'ARNs à des
biomolécules *via* un lien
N-disulfanyléthylcarbamate en position 2' de
l'uridine

Introduction

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction générale, la conjugaison de biomolécules sur des oligonucléotides²⁰⁷ suscite beaucoup d'intérêt car elle permet d'améliorer l'adressage, la pénétration cellulaire ou la stabilité en milieu biologique.²⁰⁸ Parmi les différentes méthodes de conjugaison connues²⁰⁹, les ponts disulfures se sont distingués par leur caractère réductible, permettant de coupler des composés variés puis de les libérer, et notamment en position 2' d'ARNs.^{23, 204}

Dans le chapitre précédent, nous avons eu l'occasion de conjuguer des ARNs à la doxorubicine, en utilisant des liens auto-immolables contenant des ponts disulfures. Ces derniers, avantageux dans le cadre de la stratégie de co-délivrance, peuvent s'avérer limitant en raison de l'influence du pH sur la stabilité du motif thioéthylcarbamate. En effet, l'attaque d'un thiol sur l'un des ponts disulfures peut engendrer la dégradation du lien auto-immolable, et par conséquent empêcher la réaction.

Dans la littérature, la fonction carbamate (ou uréthane) portant un lien éthylbisulfanylalkyle est rapportée pour constituer un lien auto-immolable.^{200b} En effet, après coupure de ces derniers, une réaction intramoléculaire permet de déplacer l'équilibre vers l'élimination du lien par des réactions de cyclisation, soit par formation de thiirane suivi d'une décarboxylation, soit par formation de 1,3-oxathiolan-2-one, comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent (**Schéma 52A**). Par contre, avec la configuration inverse du carbamate, cette élimination est défavorable lorsque l'atome d'azote n'est pas substitué, permettant l'obtention d'un lien avec une fonction thiol terminale stable (**Schéma 52B**).^{197d}

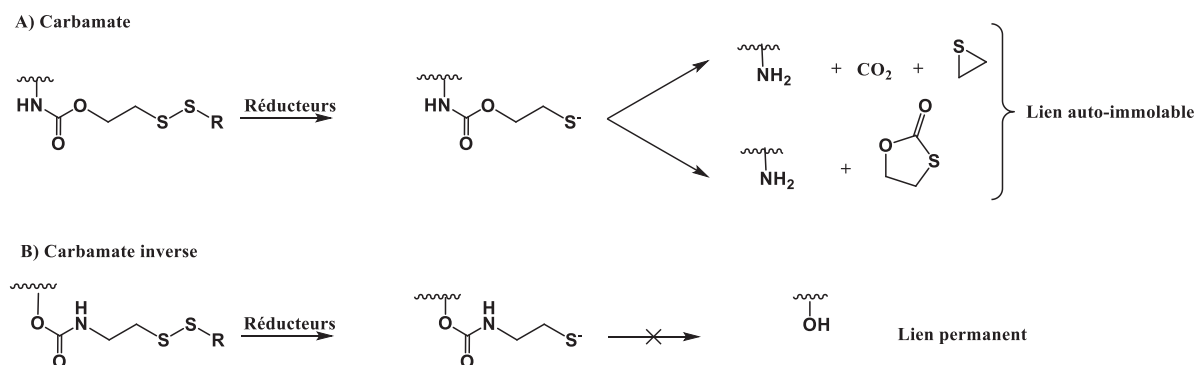


Schéma 52 : Devenir en milieu réducteur de carbamates portant une chaîne avec un pont disulfure

Il nous est donc apparu intéressant de synthétiser un oligonucléotide portant un lien *N*-disulfanyléthylcarbamate en position 2' de ribonucléotides, permettant de conjuguer des biomolécules en modulant le positionnement et le nombre de groupements introduits sur l'ARN.^{207b} Dans un premier temps, nous expliquerons l'intérêt des biomolécules que nous avons choisies pour être conjuguées à l'ARN. Nous décrirons ensuite la stratégie de synthèse du phosphoramidite uridine 2'-*O*-modifié par un lien porteur d'un pont disulfure et rattaché au ribose par une fonction carbamate. Son incorporation dans un ARN sera testée et nous

étudierons les conditions de conjugaison de différentes biomolécules sur cet ARN et leur devenir en milieu réducteur.

1. Choix des biomolécules à conjuguer

Nous avons choisi de conjuguer des molécules de classes diverses pour montrer la flexibilité de mise en œuvre de notre méthode de bioconjugaison. Une drogue anticancéreuse (la doxorubicine, présentée dans le chapitre II), des sucres (le glucose et le galactose), un acide biliaire (l'acide désoxycholique), une vitamine (la biotine), un agent réducteur (le glutathion) et un fluorophore (la coumarine) ont ainsi été introduits sur des oligonucléotides. Le couplage des peptides a été particulièrement étudié dans la littérature.^{62b, 66, 210} Il nous donc est apparu intéressant d'utiliser comme modèle le glutathion, possédant une structure pseudopeptidique, pour simuler la conjugaison des ARNs à des peptides. En revanche, l'intérêt de la doxorubicine a déjà été présenté dans le chapitre précédent et ne sera pas abordé à nouveau dans ce paragraphe.

1.1. Glucose et galactose

Les sucres sont reconnus par des récepteurs membranaires spécifiques contrôlant leur incorporation.²¹¹ En particulier, le galactose et le glucose sont connus pour améliorer la délivrance et la pénétration cellulaire (**Schéma 53**).

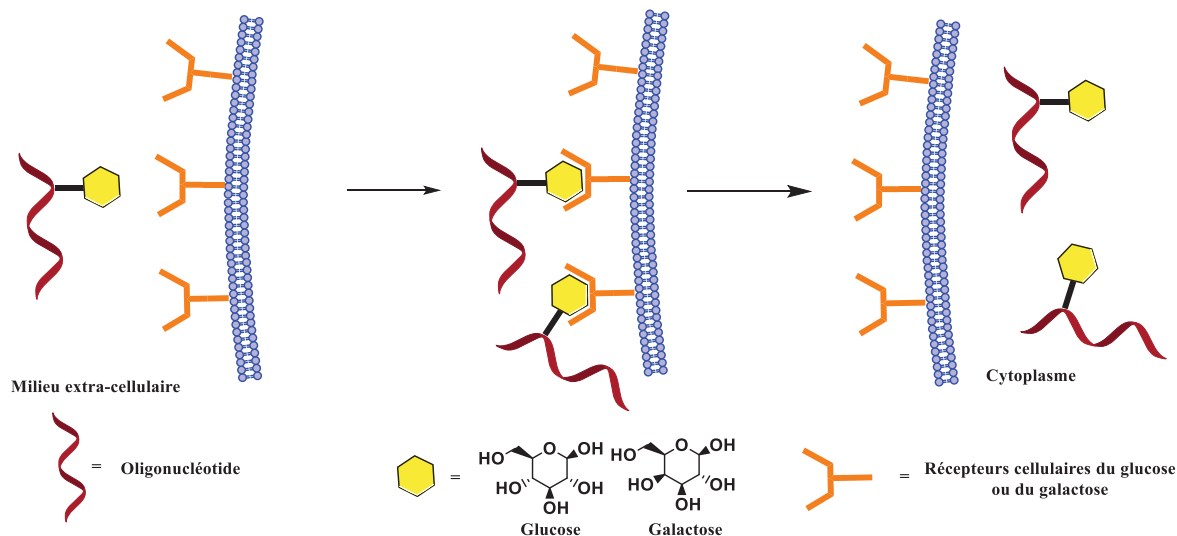


Schéma 53 : Principe de pénétration cellulaire d'oligonucléotides conjugués par un glucose ou un galactose

Le galactose est particulièrement intéressant par sa capacité à être détecté et incorporé par les récepteurs portés par les hépatocytes.²¹² Par exemple, des liposomes cationiques ornés de résidus galactoses sont reconnus²¹³, permettant la délivrance de siARNs dans les cellules du foie.²¹⁴ De nombreux travaux ont également porté sur des galactoses modifiés sous la forme de *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) (**Figure 47**).²¹⁵ Ces dérivés de

sucres, souvent sous forme trivalente, permettent de renforcer l'affinité des conjugués sur les récepteurs.

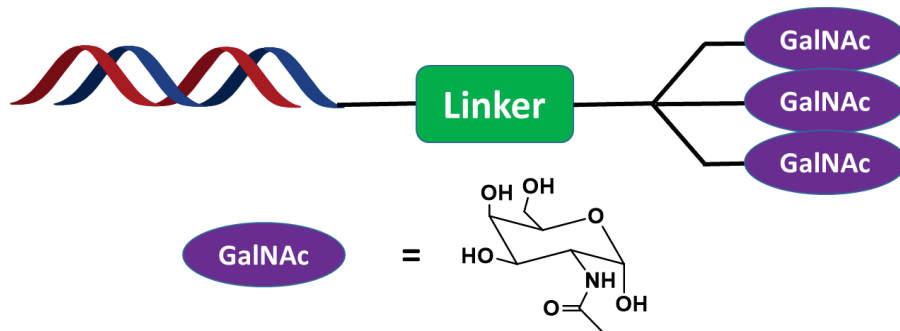


Figure 47 : Structure des siARNs conjugués à des *N*-acétylgalactosamines trivalentes

Le glucose est un nutriment indispensable pour le métabolisme cellulaire, en particulier dans la production d'ATP. Il est régulièrement intéressant dans le cadre de l'adressage de composés dans les tumeurs. En effet, les transporteurs du glucose (GLUT-1), impliqués dans le passage du glucose dans les cellules²¹⁶, sont surexprimés dans certains types de cellules cancéreuses. La conjugaison de résidus glucoses permet ainsi de favoriser la reconnaissance par ces récepteurs. Une étude récente l'a démontré en utilisant des nanoparticules magnétiques greffées pour cibler des cellules cancéreuses.²¹⁷

1.2. Acide désoxycholique

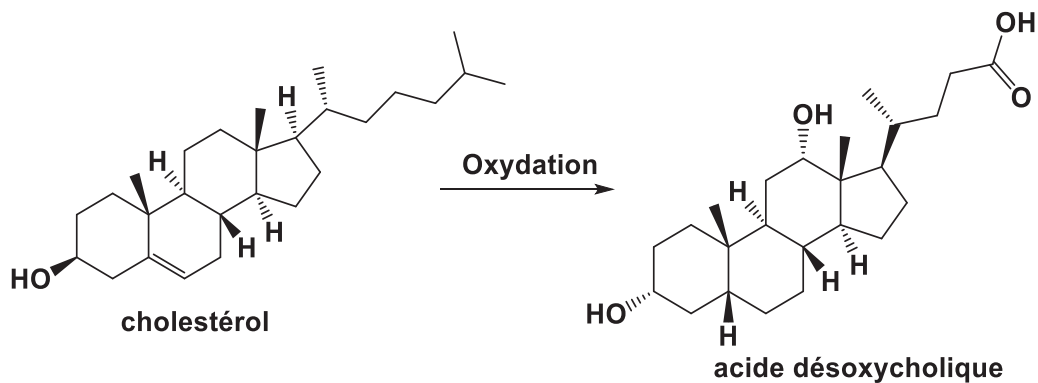


Figure 48 : Structures comparées de l'acide désoxycholique et du cholestérol

L'acide désoxycholique fait partie des acides biliaires, naturellement produits par oxydation du cholestérol dans le foie (**Figure 48**).²¹⁸ Il s'agit de molécules amphiphiles, pouvant former des micelles ayant pour première fonction de faciliter la digestion des graisses. En effet, leur squelette carboné de type stéroïde possède deux faces de lipophilie différentes. D'un côté, les hydroxyles et la fonction acide forment une face hydrophile tandis que l'autre face s'associe à d'autres molécules par interactions hydrophobes (**Figure 49**). Ils possèdent également un rôle antiprolifératif vis-à-vis des bactéries de la flore intestinale.

De plus, l'acide désoxycholique possède d'autres rôles biologiques intéressants. Des études ont mis en évidence son effet sur le système immunitaire lors de l'activation initiale des macrophages. Ces derniers sécrètent de grandes quantités de chimiokines et cytokines pour activer le reste du système immunitaire et engendrer une réponse inflammatoire. L'interaction avec les acides biliaires permet la réduction de la production de ces composés, tels que l'interleukine 6 (IL-6) ou le facteur de nécrose tumorale (TNF), et engendre ainsi une réduction du phénomène d'inflammation.²¹⁹

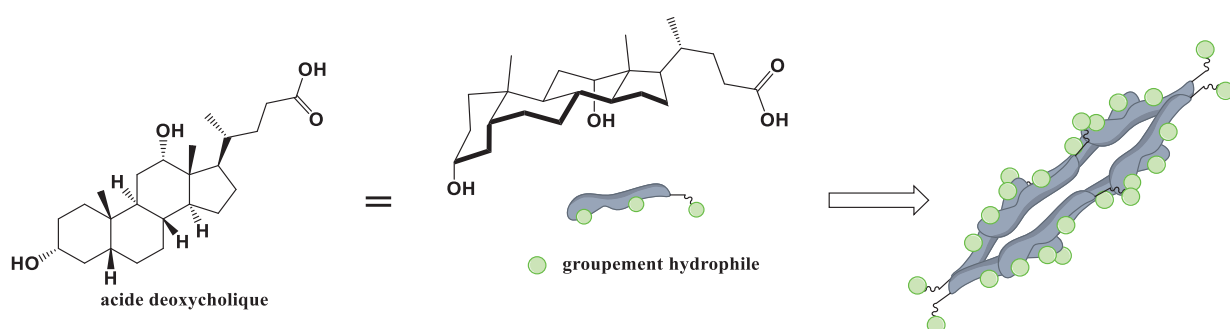


Figure 49 : Formation de micelles d'acide désoxycholique

Plus proche de notre domaine, il a été montré que la conjugaison de lipides à des oligonucléotides permettait de favoriser leur pénétration cellulaire, tout en conservant une faible toxicité contrairement aux stratégies utilisant des liposomes ou des nanoparticules.²²⁰

1.3. Coumarine

La coumarine possède une structure de type benzopyrone qui lui permet de posséder des propriétés chromophores intéressantes. L'introduction d'un groupement donneur en position 7, hydroxyle ou amine par exemple, lui confère des propriétés de fluorescence remarquables en raison d'un rendement quantique très élevé et d'une bonne stabilité à la lumière.²²¹ Elle présente également une faible toxicité, permettant son utilisation en milieu biologique, par exemple comme marqueur pour suivre la pénétration cellulaire de différentes molécules (**Figure 50**).²²² La coumarine et ses dérivés ont été utilisés pour la détection de composés variés tels que des thiols^{25d}, des métaux²²³, des cyanures²²⁴, des peroxydes²²⁵ ou encore pour suivre des variations de pH.²²⁶ Récemment, elle a également été utilisée pour détecter spécifiquement le glutathion.²²⁷ Ces larges applications potentielles en font donc une molécule d'intérêt à conjuguer à des oligonucléotides.

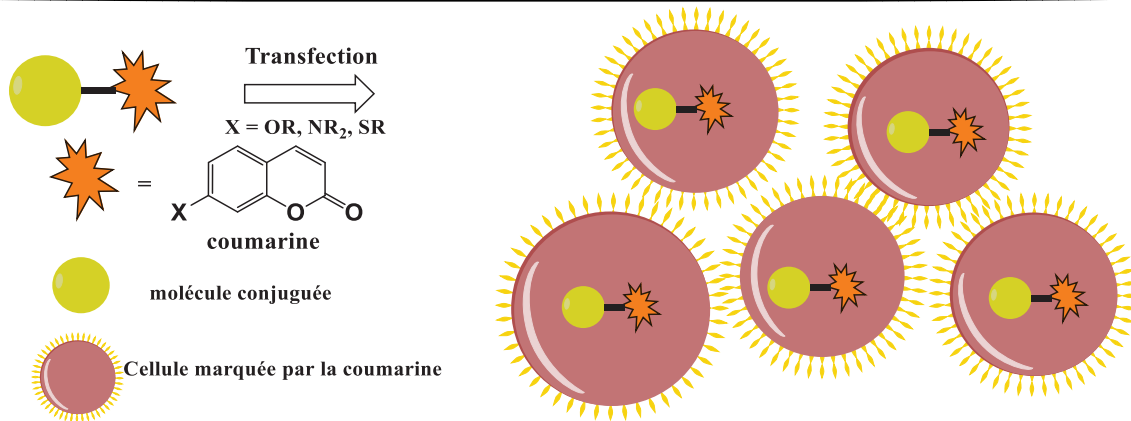


Figure 50 : Suivi par fluorescence de la pénétration cellulaire d'oligonucléotides marqués par la coumarine

1.4. Biotine

La biotine, ou vitamine B8, est une co-enzyme qui participe au métabolisme des acides gras, des glucides et des acides aminés dans toutes les espèces vivantes. Comme pour les folates, présentés dans l'introduction générale, sa reconnaissance par les récepteurs des vitamines, souvent surexprimés par les cellules cancéreuses, a permis son utilisation pour le développement de biomarqueurs pour l'imagerie de cellules cancéreuses ou l'adressage de drogues (**Figure 51**).^{197e, 228}

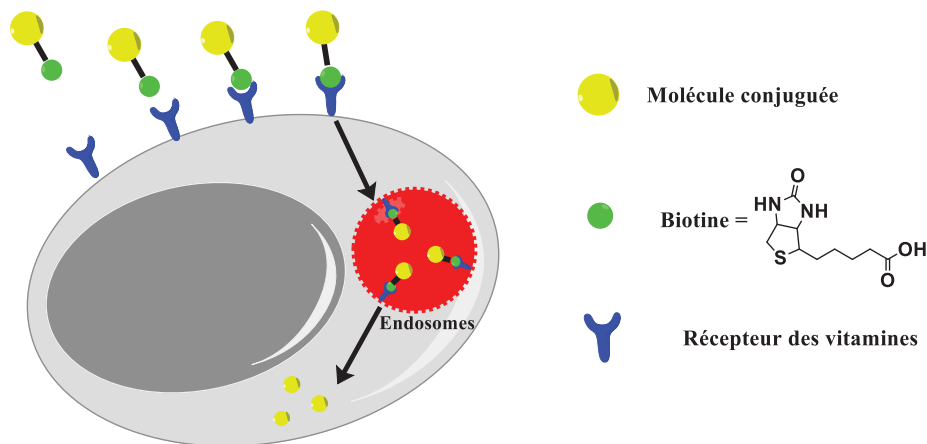


Figure 51 : Délivrance cellulaire de molécules conjuguées à la biotine

2. Stratégie de synthèse des ARNs précurseurs

2.1. Conjugaison de petites molécules actives sur des oligonucléotides

Comme nous avons pu le voir précédemment, la conjugaison de biomolécules sur des oligonucléotides par des ponts disulfures a été régulièrement étudiée. Trois exemples de conjugaison mettant en jeu la réaction d'échange thiol-disulfure vont être détaillés.

Une première méthode, développée par l'équipe de J. Winkler, utilise un groupement 2'-*O*-*tert*-butyldithioéthyle, inséré sur le nucléoside fixé sur le support (**Schéma 54**). Le groupement est stable durant la synthèse automatisée d'ADNs par la méthode aux phosphoramidite. En conditions réductrices, sur support solide, le pont disulfure libère un thiol, pouvant ensuite réagir sur des dérivés *S*-sulfonates portant des chaînes polylysines ou polyéthylène glycol. Ces ADNs conjugués ont été développés dans le cadre d'une stratégie antisens.^{85, 229} Dans une stratégie similaire, l'équipe a utilisé un groupement 2'-*O*-thioéthylène, dont la fonction thiol est protégée par un groupement trityle sur un nucléoside fixé sur le support.²³⁰ De manière générale, cette méthode est néanmoins fortement limitée par son utilisation uniquement sur le nucléoside situé à l'extrémité 3'.

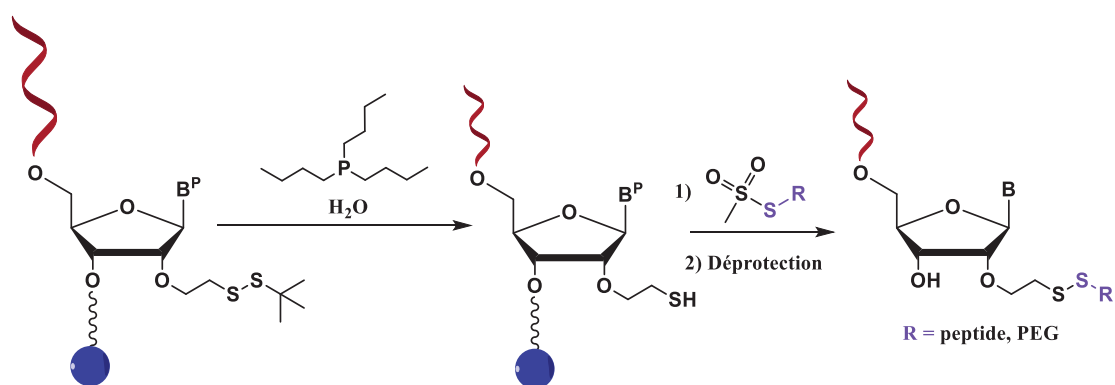


Schéma 54 : Conjugaison en position 2' avec des dérivés *S*-sulfonate

Une seconde méthode a été décrite par l'équipe de T. Oretskaya, qui a conjugué des petites molécules (le glutathion, l'acide thioglycolique et la cystéine) sur des ARNs en utilisant des nucléosides modifiés en position 2' par des fonctions amides.²⁰⁴ Le couplage a été réalisé en solution, à partir d'un ARN contenant un pont disulfure activé par un groupe pyridine (**Schéma 55**). Néanmoins, bien que ces résultats confirment la possibilité de conjuguer des petites molécules sur la position 2', la méthode présente plusieurs limitations. Les nucléosides 2'-amino entraînent des modifications structurales locales de l'oligonucléotide pouvant être problématiques. En effet, le sucre de ces derniers adoptent une conformation de type C2'-*endo*, retrouvé habituellement dans les hélices d'ADN.²³¹ Or la structure ARN de type C3'-*endo* est nécessaire pour certains mécanismes enzymatiques. La présence de nucléosides 2'-amino pourrait ainsi perturber l'activité biologique. De plus, une seule modification a été introduite par ARN, et uniquement des molécules hydrosolubles de type peptidique ont été utilisées. L'application à des composés lipophiles ou possédants des structures plus complexes est donc inconnue.

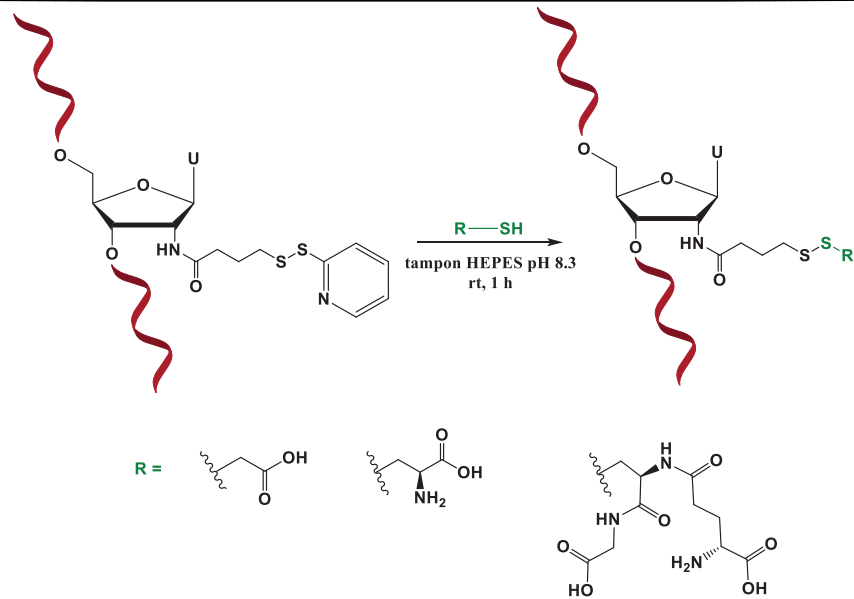


Schéma 55 : Conjugaison sur des oligonucléotides modifiés en position 2' par une fonction amide

La dernière méthode de conjugaison a été développée par l'équipe de S. Obika.²³² Ils ont utilisé des nucléosides contraints entre les positions 2' et 4' pour effectuer des réactions de couplage en position 6' d'un ADN (**Schéma 56**). La synthèse de l'ADN a été effectuée avec un phosphoramidite thymidine contenant un thiol protégé. Deux méthodes ont ensuite été utilisées pour effectuer les couplages de peptides ou de cholestérol en solution dans un tampon TEAAc à pH 7.

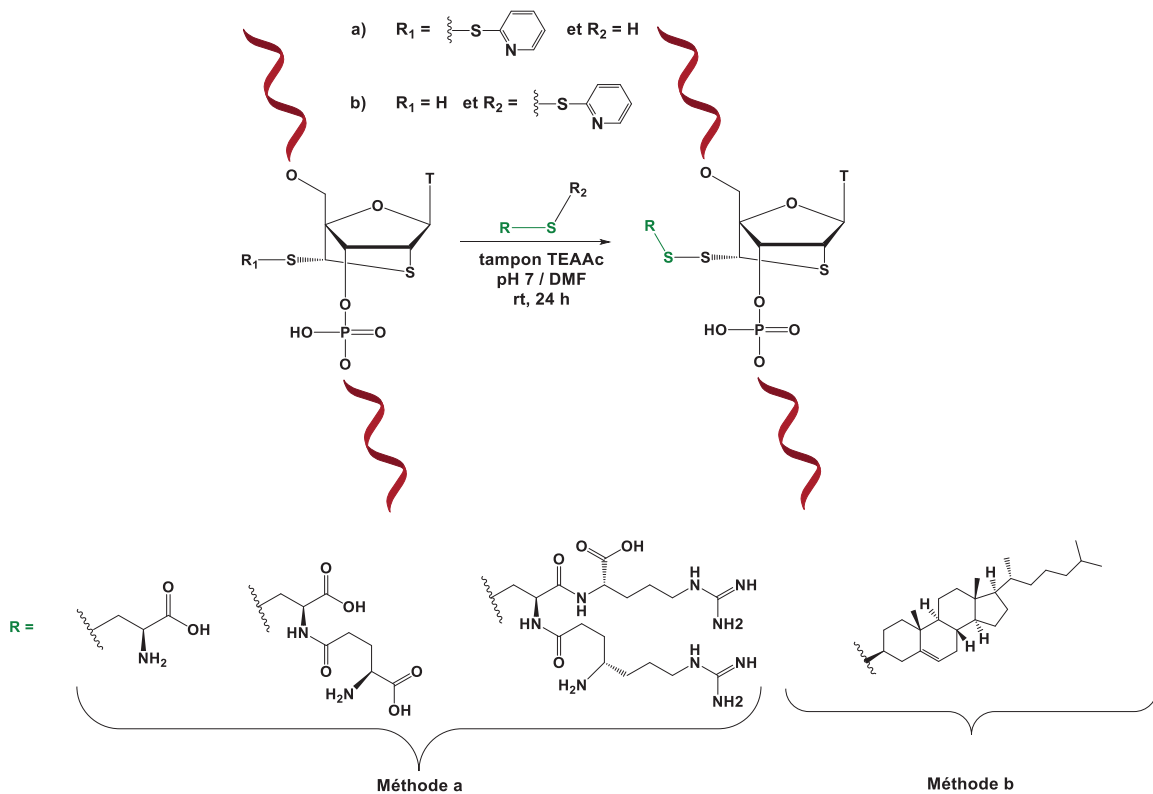


Schéma 56 : Conjugaison en position 6' de nucléosides contraints incorporés dans un ADN

Pour les peptides, la réaction a été effectuée par échange thiol-disulfure entre le thiol d'une cystéine et un pont disulfure activé porté par l'ADN (**Schéma 56a**). A l'inverse, pour le cholestérol, la réaction a eu lieu par attaque d'un thiol porté par l'oligonucléotide sur un pont disulfure activé introduit préalablement sur le cholestérol (**Schéma 56b**). Ils ont ainsi démontré que des biomolécules conjuguées sur les oligonucléotides ne perturbaient pas significativement la formation de duplex d'ADNs / ADNs et ADNs / ARNs, tout en améliorant la stabilité enzymatique. Ils ont ensuite confirmé la possibilité de libérer ces molécules conjuguées en présence de glutathion. Néanmoins, l'inconvénient majeur de cette stratégie est la synthèse complexe des nucléosides contraints.

Ces trois stratégies présentées ne sont donc pas optimales pour introduire différents types de groupements sur des ARNs. Nous avons donc voulu développer une nouvelle méthode pour conjuguer, *via* des ponts disulfures, un ou plusieurs groupements sur une fonction carbamate introduite en position 2' de ribonucléotides, en utilisant une gamme plus variée de biomolécules que celles conjuguées dans les études précédemment décrites.

2.2. Présentation des stratégies de synthèse

Nous avons adapté la méthode développée dans le chapitre I dans l'approche prodroge de siARNs pour conjuguer des biomolécules en solution. La stratégie consiste à effectuer une réaction d'échange thiol-disulfure entre un ARN portant une entité éthyldisulfanylpyridine ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-S-Py}$) *via* une fonction carbamate en 2' et une fonction SH de la biomolécules (**Schéma 57**). En effet, les carbamates sont des fonctions fréquentes en chimie médicinale, en raison de leur stabilité et de leur capacité à mimer des liaisons peptidiques.²³³ Leur introduction sur la position 2' d'un oligonucléotide a déjà été décrite avec des dérivés 2'-*O*-carbamoyluridines²³⁴ portant des fluorophores²³⁵ ou des groupements cationiques.²³⁶

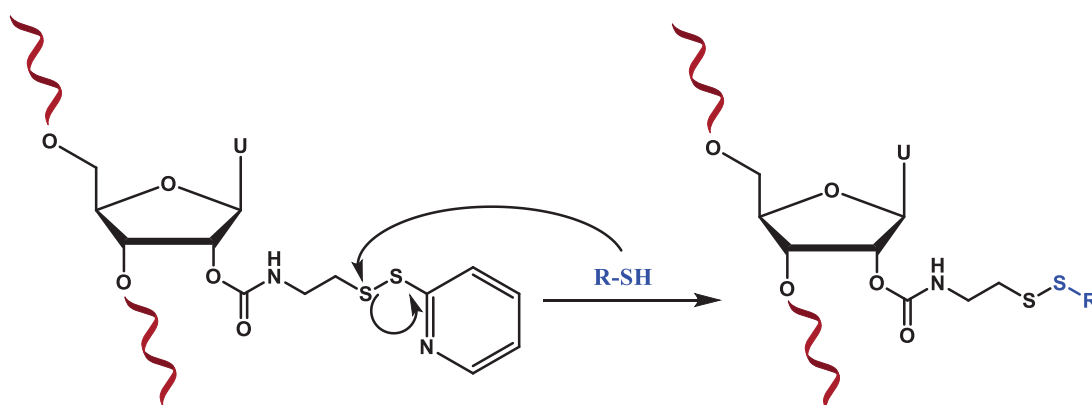


Schéma 57 : Conjugaison en solution par réaction d'échange thiol-disulfure

Cette stratégie de synthèse nécessite dans un premier temps la préparation d'un oligonucléotide comportant une modification 2'-*O*-(pyridin-2-yl)disulfanyl-éthylaminocarbonyl) (2'-*O*-PySSEAC). Pour ce faire, nous avons préparé et incorporé le

phosphoramidite de l'uridine 2'-*O*-(2-(acétylthio)-éthylaminocarbonyl) (2'-*O*-AcSEAC) **36** dans un ARN. La réaction d'échange thiol-disulfure entre l'entité S-Ac et la 2,2'-dithiodipyridine a ensuite été effectuée sur support pour obtenir, après déprotection à l'ammoniaque, l'ARN 2'-*O*-PySSEAC porteur de l'entité S-S-pyridine prête à réagir avec une biomolécule (**Schéma 58**).

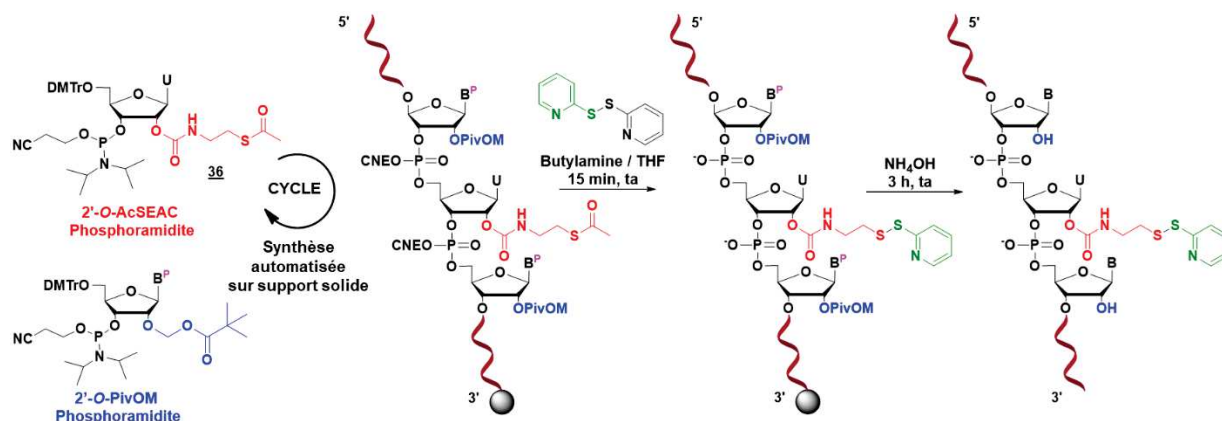


Schéma 58 : Stratégie de synthèse des ARNs 2'-*O*-PySSEAC / 2'-OH

A l'exception du glutathion, les biomolécules choisies pour le couplage en solution ne portent pas de fonctions thiols. Deux méthodes de synthèses ont été mises en œuvre en utilisant des dérivés thiols des molécules à conjuguer (**Schéma 59**) :

- La méthode A consiste en un **couplage direct** des molécules dans un milieu tamponné. Elle a été utilisée pour les dérivés thiols disponibles commercialement, c'est-à-dire le glucose (sous forme 1-thio- β -D-glucose), le galactose (1-thio- β -D-galactose), le glutathion et la coumarine (7-mercapto-4-méthylcoumarine)
- La méthode B est un **couplage en deux étapes**, pour les composés indisponibles commercialement sous forme de thiol, c'est-à-dire la biotine, la doxorubicine et l'acide désoxycholique. Sur ces composés, l'entité éthyldisulfanylpyridine a été introduite en deux ou trois étapes. Ensuite, la réaction de conjugaison de ces dérivés disulfures a été effectuée en deux étapes sans purification intermédiaire. Les dérivés éthyldisulfanylpyridines des biomolécules ont été mis en présence de TCEP pour former un thiol, qui a ensuite réagi sur l'ARN 2'-*O*-PySSEAC.

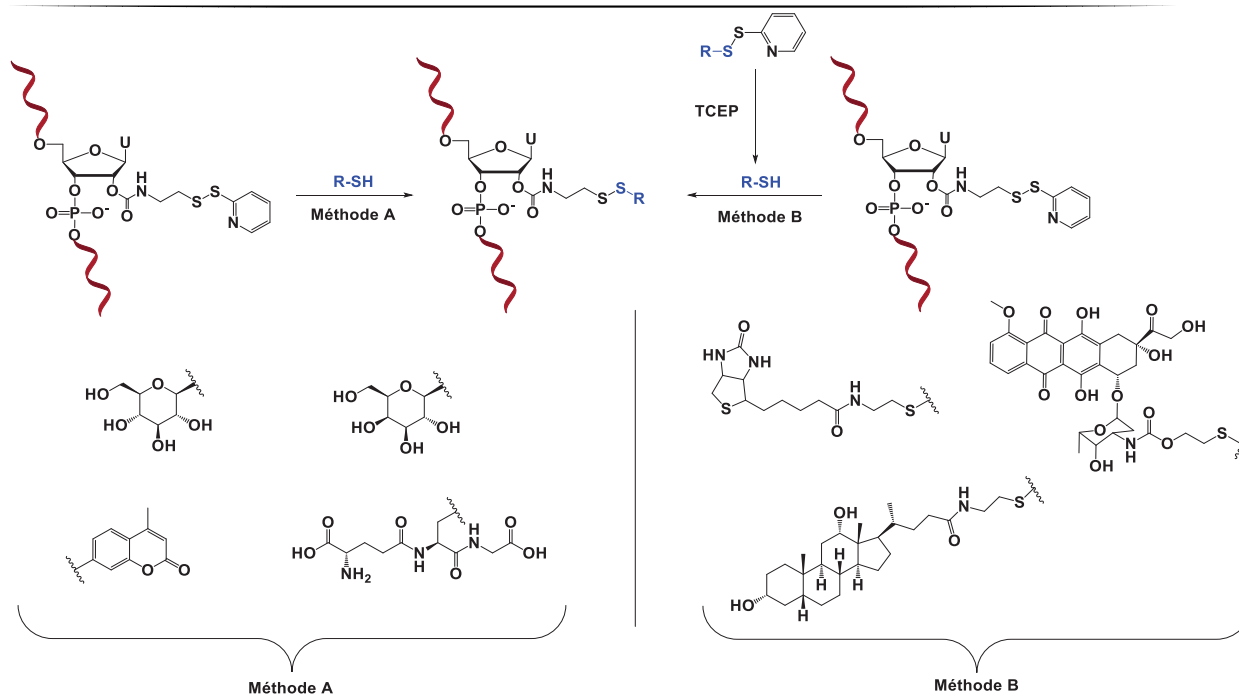


Schéma 59 : Présentation des deux méthodes de conjugaison et des dérivés thiols utilisés

2.3. Préparation du synthon 2'-O-(2-(acétylthio)-éthylaminocarbonyl) uridine phosphoramidite **36**

L'uridine phosphoramidite 2'-O-AcSEAC **36** a été obtenue en six étapes à partir de l'uridine protégée en position 5' et 3' par un groupe tétraisopropyldisiloxane (TIPS) (Schéma 60).

La première étape consiste à former en position 2' un carbonate **37** activé par un groupe 4-nitrophényle par réaction de la 3',5'-O-TIPS uridine avec du chloroformiate de 4-nitrophényle. Du chlorure de bromoéthylammonium permet de former un carbamate **38** substitué par un lien bromoéthyle en position 2' en présence de triéthylamine dans la pyridine, avec un rendement de 98%. Une substitution nucléophile est ensuite effectuée par réaction du thioacétate de potassium sur l'atome de brome, en présence d'éther 18-couronne-6, pour former la fonction thioester.^{88, 136} L'uridine modifiée en position 2' par le groupe AcSEAC **39** est ainsi obtenue avec un rendement de 80%. Les hydroxyles en 5' et 3' ont été déprotégés grâce au complexe triéthylamine trihydrofluorure (Et₃N, 3HF) pour donner l'uridine 2'-O-AcSEAC **40** avec un rendement de 92%. Puis, l'hydroxyle en 5' a été protégé classiquement avec un groupement DMTr en présence de DIEA pour former le produit 2'-O-AcSEAC-5'-O-DMTr **41** avec un rendement de 98%. Enfin, le phosphoramidite de l'uridine 2'-O-AcSEAC **36** a été préparée par réaction avec le 2-cyanoéthyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite en présence de DIEA dans le CH₂Cl₂, avec un rendement de 89%.

Le phosphoramidite **36** a été obtenu avec un rendement global de 51% pour six étapes. Il a ensuite été incorporé efficacement dans des ARNs pour effectuer les réactions de couplage avec les biomolécules sélectionnées.

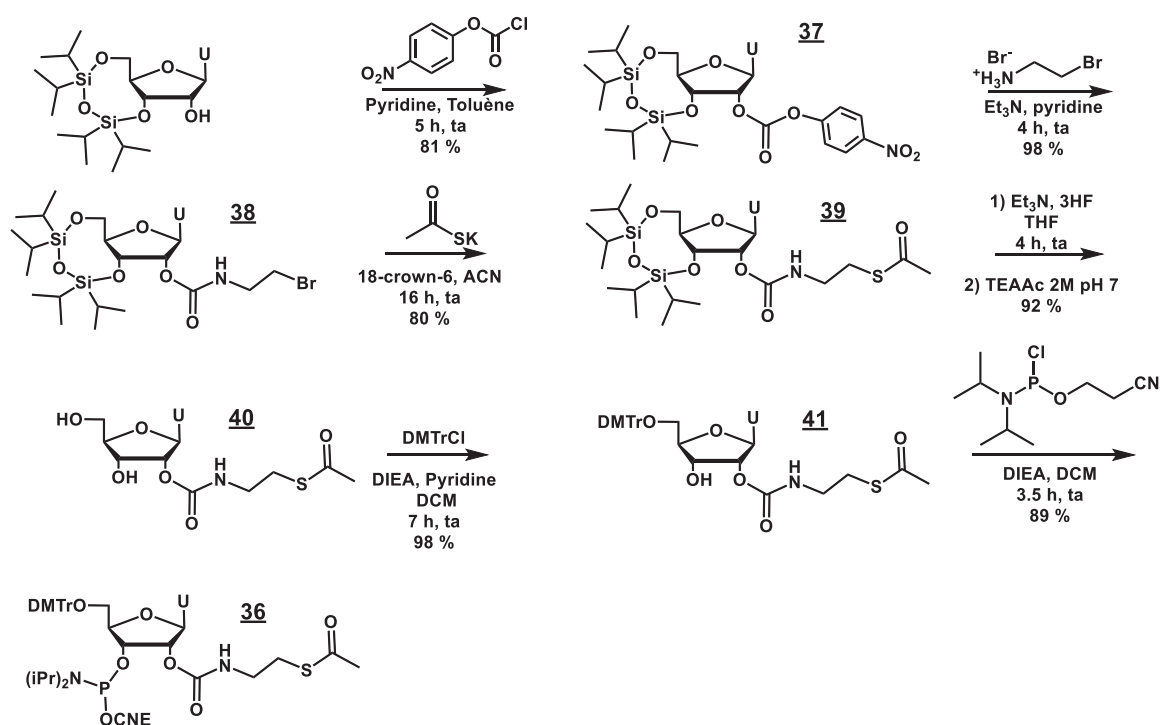


Schéma 60 : Synthèse du phosphoramidite de l'uridine 2'-O-AcSEAC **36**

2.4. Synthèse des ARNs modifiés 2'-O-PySSEAC

L'ARN **42** (Tableau 15), dont la séquence correspond au brin sens du siARN ciblant le sarcome d'Ewing et contenant une uridine 2'-O-PySSEAC introduite au centre de la séquence, a été obtenu en deux étapes (Schéma 61). Dans un premier temps, l'ARN contenant l'uridine 2'-O-AcSEAC et des ribonucléotides 2'-O-PivOM, précurseurs des 2'OH, a été assemblé sur support solide avec un synthétiseur. Le rendement d'incorporation du phosphoramidite de l'uridine 2'-O-AcSEAC **36** a été supérieur à 98% dans les conditions classiques de synthèse d'ARN (solution à 0,1 M dans l'acétonitrile, temps de couplage de 180 secondes).

N°		m/z calculée	m/z obtenue ^a	ARN d'intérêt ^b (%)	Quantités isolées ^c (nmol)
42	5' GCA GCA GAA CCC U_{PySSEAC} UC UUA UGA 3'	6867,6	6867,9	51	36,9

Tableau 15 : Caractérisation de l'ARN **42**

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ($[M-H]$)

^bPourcentage du pic de l'ARN d'intérêt en aire relative du chromatogramme IEX- HPLC du brut de déprotection à 260 nm

^cQuantités isolées après purification mesurées par spectrophotométrie à 260 nm à partir d'une synthèse à l'échelle de 1 μ mol

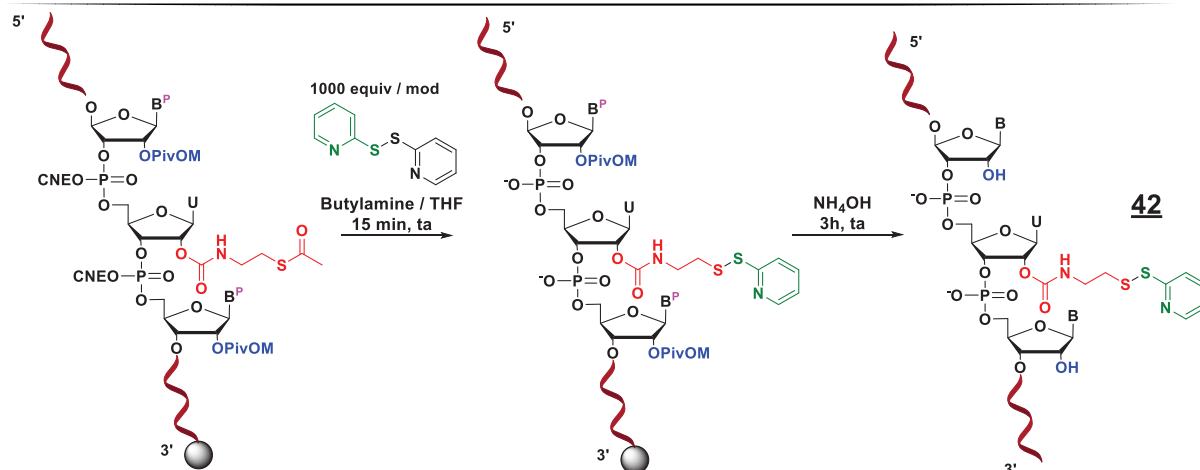


Schéma 61 : Conditions de synthèse de l'ARN 2'-O-PySSEAC **42** par transformation post-synthétique

Dans un second temps, le motif disulfanylpyridine a été introduit sur l'ARN supporté à partir de la fonction thioacétyle (**Schéma 61**). Afin de limiter la formation du dimère interbrins, comme observé dans le chapitre précédent, nous avons utilisé un très large excès de 2,2'-dithiodipyridine. L'oligonucléotide a ainsi été traité avec 1000 équivalents de 2,2'-dithiodipyridine dans un mélange THF / BuNH₂ (3:1, v/v) pendant 15 min. L'étape suivante est le décrochage de l'ARN du support solide et la déprotection des nucléobases et des positions 2'-OH avec une solution d'ammoniaque pendant 3 h à température ambiante pour obtenir l'ARN **42**.

L'analyse de l'ARN brut par IEX-HPLC montre deux pics majoritaires avec respectivement des temps de rétention de 16,0 min (51%) et 17,9 min (16%) (**Figure 52**). Après purification, ces deux pics ont été isolés et caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le premier correspond à l'ARN 2'-O-PySSEAC **42** souhaité. Le spectre de masse de **42** purifié montre la présence de deux pics (6756,5 Da et 6867,9 Da) dont un correspondant à la masse attendue (6867,6 Da). La différence de masse entre les deux pics (perte de masse de 110) correspond à la perte du résidu S-pyridine, due à la coupure partielle du pont S-S par le laser du spectromètre de masse MALDI-TOF, expliquant la détection de la masse de l'espèce sous forme thiolate (6756,5 Da).

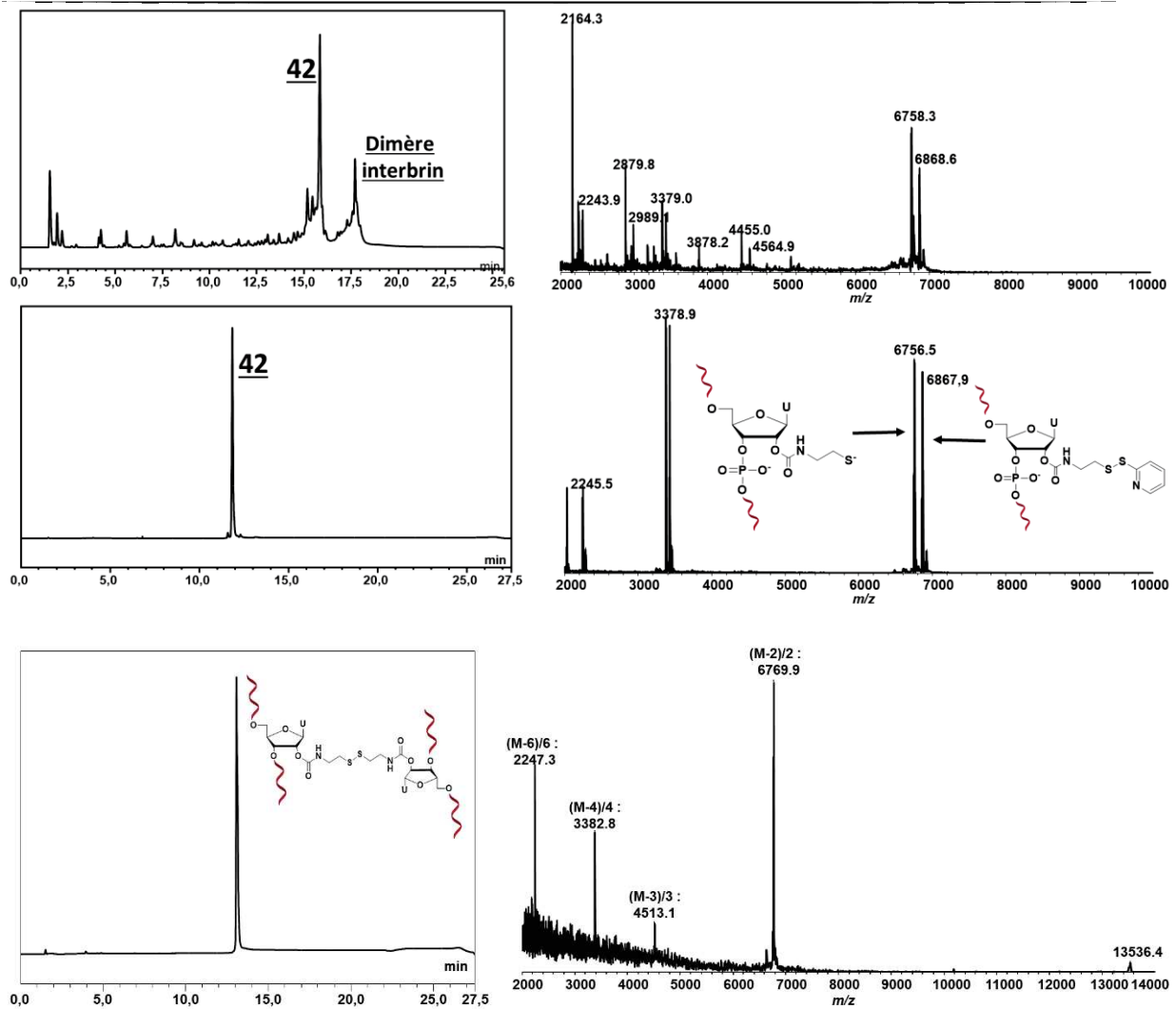


Figure 52 : Chromatogrammes HPLC et spectres de masse MALDI-TOF de l'ARN brut **42** (en haut), de l'ARN **42** pur (au milieu), et du dimère interbrins purifié (en bas)

Le second pic majoritaire correspond au dimère interbrins de deux oligonucléotides reliés par un pont disulfure (**Figure 52**). Il a été caractérisé par spectrométrie de masse à 13536,4 Da. L'intensité du pic correspondant n'est pas très élevée, en partie due à la rupture du pont S-S par le laser qui redonne le pic à 6769,9 Da du composé thiolate.

Malgré la formation de dimères, la proportion de 51% obtenue pour l'ARN 2'-*O*-PySSEAC **42** dans le brut indique toutefois l'efficacité de la méthode (**Tableau 15**).

3. Conjugaison en solution des biomolécules

3.1. Mise au point des conditions de couplage en solution

Les différentes réactions de couplage ont été effectuées en solution à partir de l'ARN 2'-*O*-PySSEAC **42**, en utilisant les deux méthodes de couplage présentées au paragraphe 2.2.

3.1.1. Méthode A : Couplage direct

Le thioglucose et le thiogalactose, le glutathion et la 7-mercapto-4-méthylcoumarine ont été directement conjugués à l'ARN par la méthode A. La réaction est effectuée avec 100 équivalents de la biomolécule à conjuguer à une concentration de 10 mM, le large excès favorisant le rendement de la conjugaison. Toutes les réactions ont été effectuées à 37 °C pendant 24 h dans des compositions de solvants variables.

Pour les ARNs couplés au 1-thio-β-D-glucose **43**, au 1-thio-β-D-galactose **44** et au glutathion **45**, du tampon HEPES à pH 8 (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,05 mM EDTA, 7,5 mM HEPES) a été utilisé. Pour coupler la 7-mercapto-4-méthylcoumarine **46**, un mélange DMF / tampon HEPES (1:1, v/v) a été choisi pour obtenir une solubilité totale (**Schéma 62, Tableau 16**).

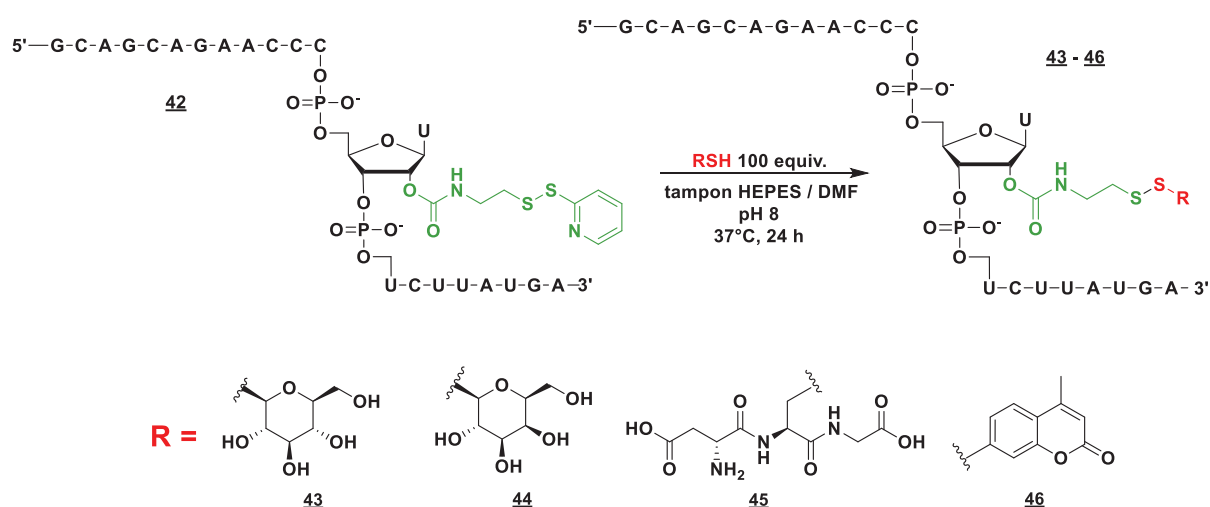


Schéma 62 : Méthode A de conjugaison

Conjugaison avec l'ARN 42 : 5'GCA GCA GAA CCC U _{PySSEAc} UC UUA UGA ^{3'}						
N°		Proportion DMF (%)	m/z calculée	m/z obtenue ^a	Taux de conjugaison (%) ^b	Rendement de couplage (%) ^c
43	Glucose	0	6952,4	6952,8	63	37
44	Galactose	0	6952,4	6953,1	85	46
45	Glutathion	0	7066,6	7063,7	70	42
46	Coumarine	50	6948,4	6945,4	72	46

Tableau 16 : Synthèse des ARNs conjugués **43** à **46** par la méthode A

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ([M-H])

^bPourcentage du pic de l'ARN d'intérêt en aire relative du chromatogramme IEX- HPLC du brut de déprotection à 260 nm

^cRendement calculé à partir des quantités de produit pur déterminées par spectrophotométrie à 260 nm

Les oligonucléotides conjugués avec le 1-thio- β -D-glucose (**43**), le 1-thio- β -D-galactose (**44**), le glutathion (**45**) et la 7-mercapto-4-méthylcoumarine (**46**) ont été obtenus dans des proportions de 63% à 85% (**Figure 53**). Ces pourcentages ont été déterminés par mesure de l'aire relative des pics du chromatogramme IEX-HPLC à 260 nm, ils indiquent des réactions non quantitatives, expliquées par des dégradations chimiques de l'ARN dues à la présence des biomolécules en concentrations élevées. Cette dégradation est mise en évidence par des pics de temps de rétention plus faibles, comme par exemple le pic à 11,4 min sur le chromatogramme de l'ARN **46**.

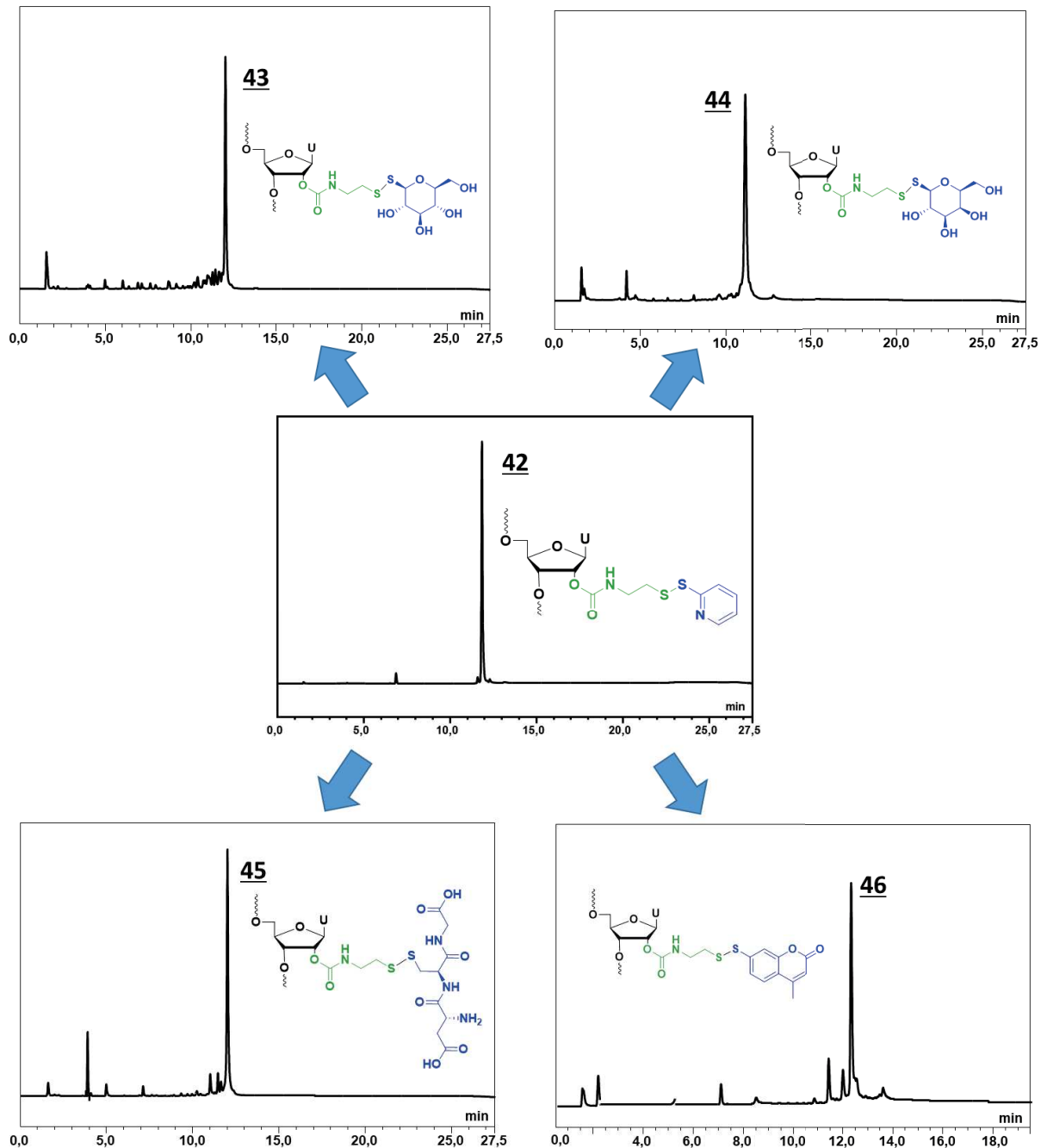


Figure 53 : Chromatogrammes IEX-HPLC du brut de la réaction de conjugaison donnant les ARNs conjugués **43** à **46** à partir de l'ARN **42** et des biomolécules correspondantes

Chapitre III : Conjugaison d'ARNs à des biomolécules *via* un lien *N*-disulfanyléthylcarbamate en position 2' de l'uridine

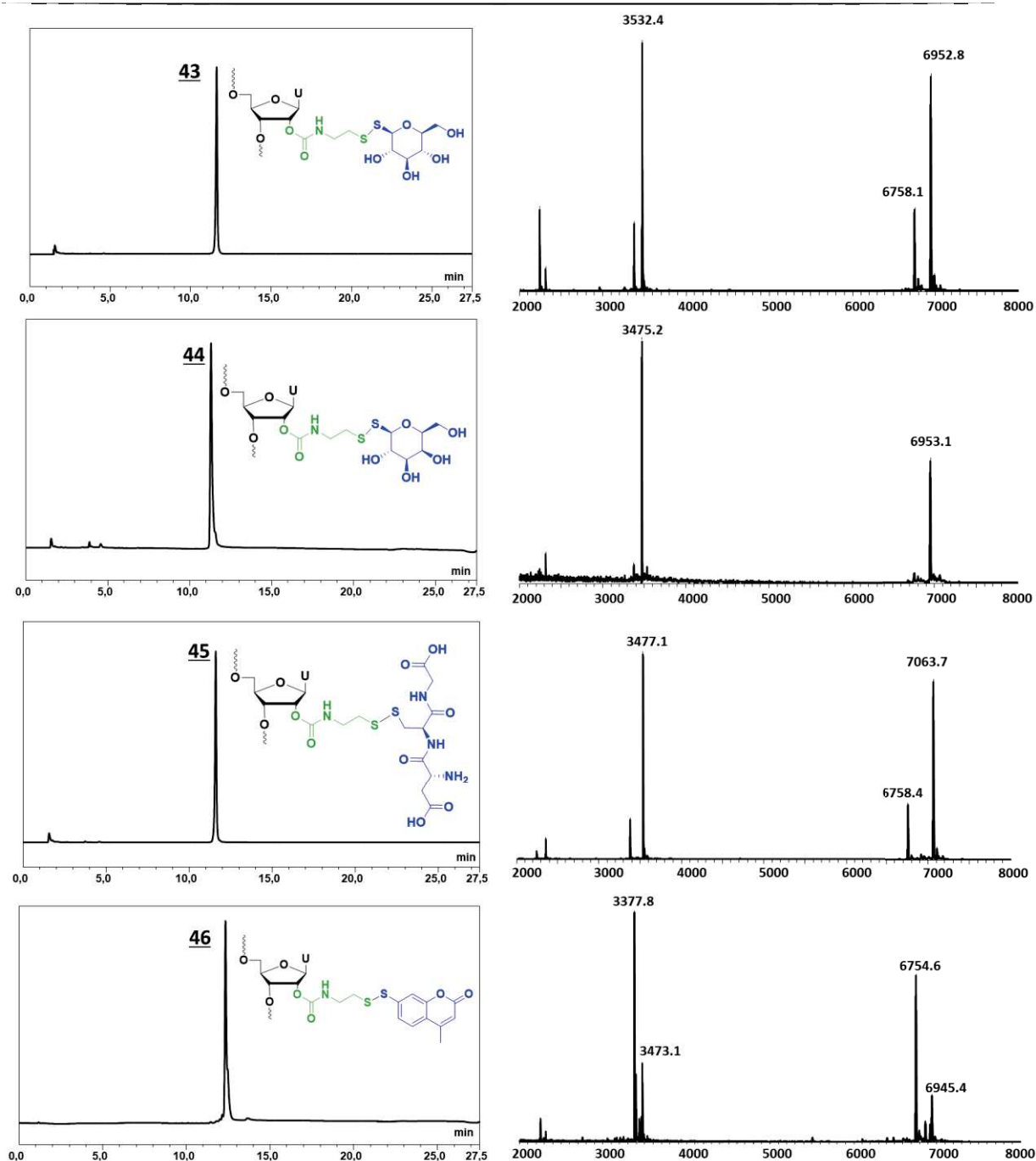


Figure 54 : Chromatogrammes IEX - HPLC et spectres de masse MALDI - TOF des ARNs **43** à **46** après purification

Ces différents ARNs **43** à **46** conjugués ont ensuite été purifiés par IEX-HPLC puis dessalés et lyophilisés. Ils ont été caractérisés (**Figure 54**) et isolés avec une pureté satisfaisante et des rendements globaux de 37% à 46%. Cette diminution par rapport au taux de conjugaison obtenu dans le brut IEX-HPLC s'explique par les étapes de purification et de dessalage nécessaires pour isoler les composés. La coupure du pont disulfure lors de l'analyse MALDI-TOF est une nouvelle fois détectable sur le spectre de masse, dans des proportions variables selon les composés. En particulier, pour l'ARN **46** couplé à la 7-mercapto-4-

méthylcoumarine, le pic à 6945 Da est d'intensité faible en comparaison à celui à 6754 Da correspondant au thiolate.

Ces résultats confirment néanmoins l'intérêt de cette méthode simple pour effectuer la conjugaison d'ARN avec des molécules possédant une fonction thiol libre.

3.1.2. Méthode B : Couplage en deux étapes

Le couplage des composés non disponibles commercialement avec une fonction thiol, la doxorubicine, la biotine et l'acide désoxycholique, a impliqué leur modification par le groupe éthyldisulfanylpyridine. La (2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)-éthylcarbamate)doxorubicine **23**, dont la synthèse a été décrite dans le chapitre II, a été réutilisée.

3.1.2.1. *Introduction d'une fonction disulfanylpyridine sur les biomolécules ne contenant pas de groupement thiol*

3.1.2.1.1. Synthèse du dérivé aminoéthylsulfanylpyridine **47**

L'étape préalable à la modification de la biotine et de l'acide désoxycholique consiste en la synthèse du dérivé aminoéthylsulfanylpyridine **47**. Sa préparation a été effectuée en une étape avec un rendement de 86% à partir du chlorhydrate de cystéamine et de la 2,2'-dithiodipyridine dans le méthanol (**Schéma 63**).

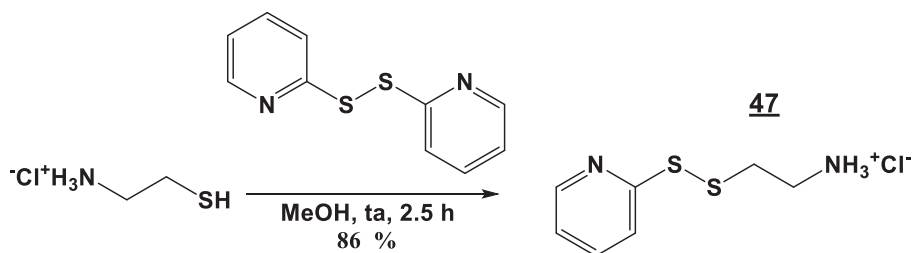


Schéma 63 : Synthèse du dérivé aminoéthylsulfanylpyridine **47**

3.1.2.1.2. Synthèse du dérivé S-S-pyridine de la biotine **48**

La synthèse de la *N*-2-(pyridin-2-yl)disulfanyléthylamide-(+)-biotine **48**, adaptée d'un protocole décrit par l'équipe de M. Famulok⁷³, a été effectuée en une étape à partir de la biotine commerciale activée sous forme d'ester hydroxysuccinimide (**Schéma 64**). La réaction consiste en la formation d'une liaison amide entre l'aminéthylsulfanylpyridine **47** et la biotine activée NHS, en présence de triéthylamine dans un mélange d'eau, de DMF et de CH₃CN. Après 4 h de réaction à température ambiante, le produit **48** a été obtenu avec un rendement de 47% après purification sur gel de silice.

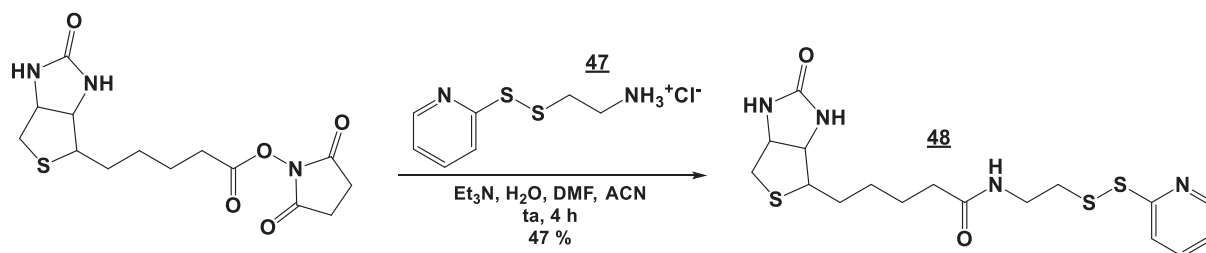


Schéma 64 : Synthèse de la *N*-2-(pyridin-2-ylsulfanyl)éthylamide-(+)-biotine **48**

3.1.2.1.3. Synthèse du dérivé S-S-pyridine de l'acide désoxycholique **49**

La synthèse du dérivé de l'acide désoxycholique S-S-pyridine : *N*-(2-(pyridin-2-ylsulfanyl)éthyl)-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide **49** a été effectuée à partir de l'acide désoxycholique (**Schéma 65**) selon un protocole adapté de l'équipe de E. Sievanen^{218b}. Elle consiste en deux étapes successives sans isoler l'intermédiaire. Tout d'abord, l'utilisation de chloroformiate d'éthyle en présence de Et₃N dans le 1,4-dioxane pendant 30 min a permis la formation d'un intermédiaire anhydride activé. L'amine du dérivé **47** réagit ensuite directement sur le carbonyle de cet anhydride activé pour former le composé **49** *via* une fonction amide lié à l'éthylsulfanylpyridine. Après 20 h de réaction à température ambiante, le produit **49** a été obtenu avec un rendement de 43% après purification sur gel de silice.

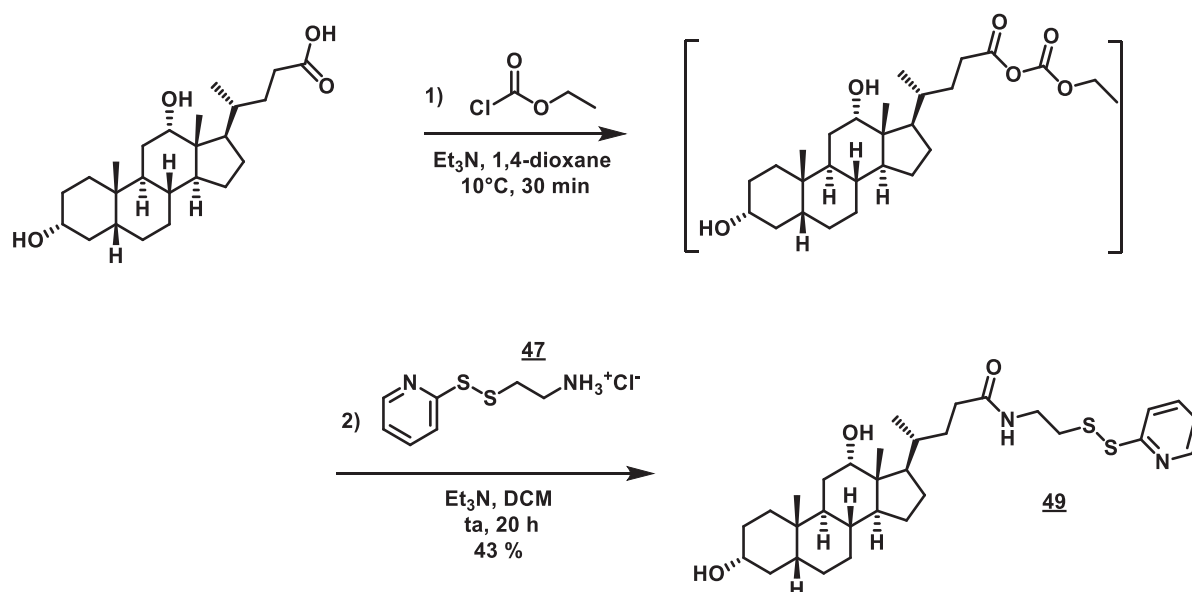


Schéma 65 : Synthèse du dérivé de l'acide désoxycholique S-S-pyridine **49**

Chapitre III : Conjugaison d'ARNs à des biomolécules *via* un lien *N*-disulfanyléthylcarbamate en position 2' de l'uridine

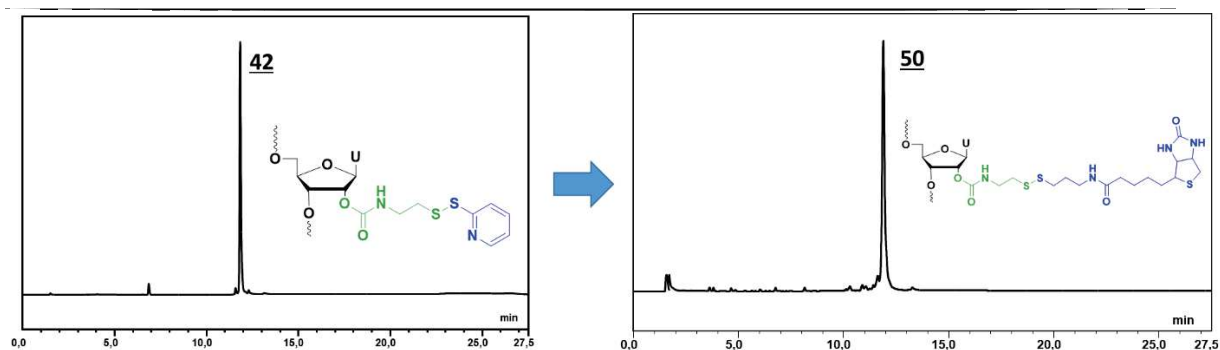


Figure 55 : Chromatogrammes IEX-HPLC du brut de couplage de l'ARN conjugué **50** à partir de l'ARN S-S-pyridine **42**

Conjugaison avec l'ARN 42 : ^{5'} GCA GCA GAA CCC U _{Pys} SEAC UC UUA UGA ^{3'}								
N°		Durée	Proportion DMF (%)	Equivalents biomolécule / TCEP	m/z calculée	m/z obtenue ^a	Taux de conjugaison (%) ^b	Rendement de couplage (%) ^c
50	Biotine	24 h	25	100 / 80	7059,6	7061,8	89	46
51	Doxorubicine	5 min	50	100 / 80	7403,9	-	85	-
			50	20 / 16		7405,9	88	63
52	Acide désoxycholique	24 h	30	100 / 80	7207,9	7207,5	42	36

Tableau 17 : Synthèse des ARNs conjugués **50** à **52** par la méthode B

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ([M-H])

^bPourcentage du pic de l'ARN d'intérêt en aire relative du chromatogramme IEX- HPLC ou RP-HPLC du brut de déprotection à 260 nm

^cRendement calculé à partir des quantités de produit pur déterminées par spectrophotométrie à 260 nm pour **50** et **52** et spectrophotométrie à 481 nm pour **51**

L'ARN S-S-pyridine **42** a été couplé au dérivé de l'acide désoxycholique S-S-pyridine **49** dans les mêmes conditions. Néanmoins, l'ARN **52** a été obtenu avec seulement une proportion de 42% dans le chromatogramme du brut de couplage par HPLC phase inverse (**Tableau 17, Figure 56**). Après purification par HPLC phase inverse, l'ARN **52** a été isolé avec 36% de rendement (**Figure 57**), cette faible proportion pouvant être due à l'encombrement stérique de l'acide désoxycholique. De plus, des dégradations chimiques de l'ARN sont visibles sur le chromatogramme HPLC du brut de réaction, potentiellement dues à la présence de **49** en concentrations élevées (**Figure 56**). En effet, l'acide désoxycholique est connu pour induire des dégradations de l'ADN ou de l'ARN.²³⁷

L'ARN **51** conjugué à la doxorubicine a tout d'abord été synthétisé dans les mêmes conditions que dans le chapitre II. 100 équivalents de doxorubicine ont été mélangés avec 80 équivalents d'une solution de TCEP dans un mélange tampon HEPES pH 8 / DMF (1:1, v/v) pendant 2h, avant d'être ajoutés sur l'ARN pendant 5 min. L'analyse par chromatographie HPLC en phase inverse (**Figure 56**) a révélé un taux de conjugaison de 85%, légèrement meilleur qu'avec les liens auto-immolables (69% à 80% pour les modifications en milieu de séquence). La réaction a ensuite été testée avec seulement 16 équivalents de TCEP et 20 équivalents de doxorubicine modifiée **23**. Après 5 min de réaction à 37 °C, l'intégralité de l'ARN **42** de départ a été consommée. Comme précédemment, la réaction a été arrêtée par l'addition de tampon pH 5. L'ARN conjugué **51** a été formé à 88% d'après l'analyse HPLC phase inverse et a été isolé avec un rendement de 63% après purification par chromatographie HPLC en phase inverse (**Tableau 17, Figure 57**). Ces conditions de couplage montrent une conversion similaire pour une quantité de réactifs cinq fois moins importante. Elles n'ont pas encore été testées sur la conjugaison d'autres molécules sur l'ARN.

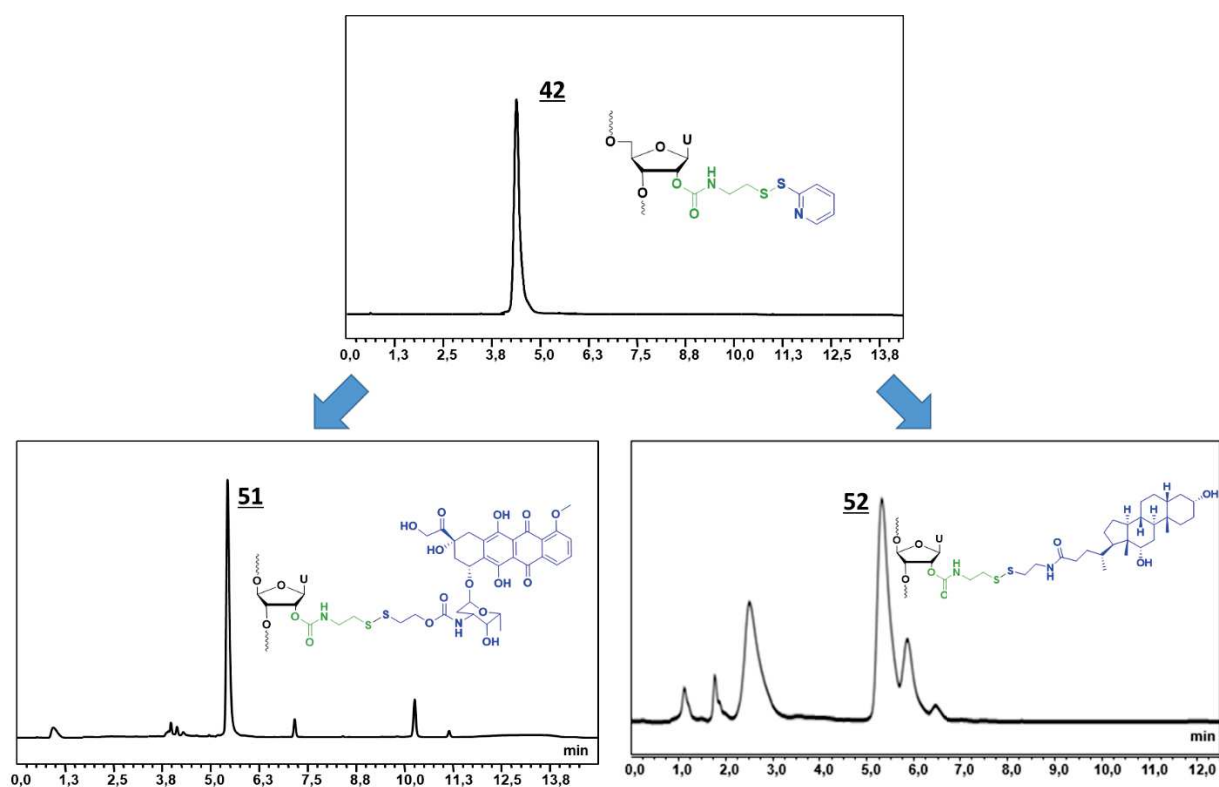


Figure 56 : Chromatogrammes HPLC phase inverse des bruts de couplages des ARNs conjugués **51** et **52** (couplage à 20 équivalents de doxorubicine) à partir de l'ARN **42**

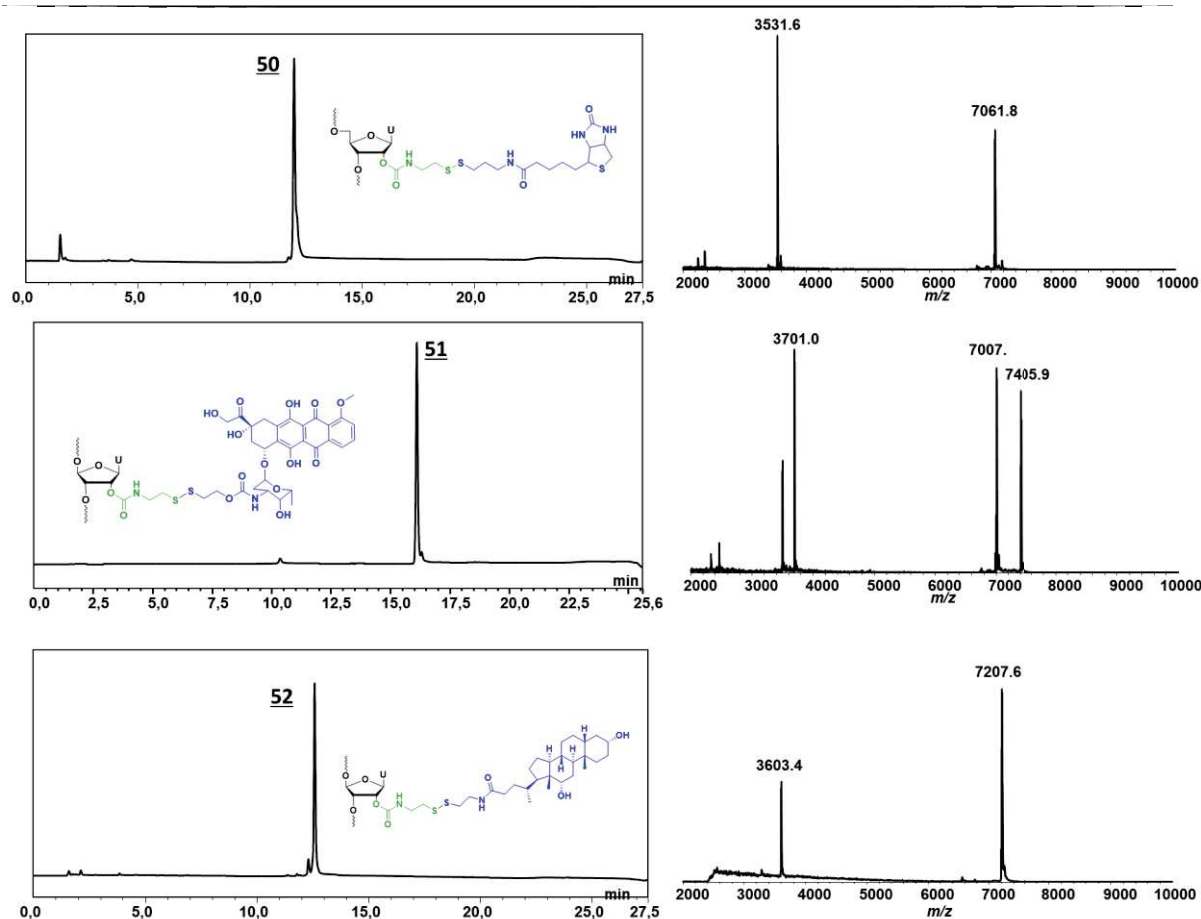


Figure 57 : Chromatogrammes IEX - HPLC et spectres de masse MALDI - TOF des ARNs conjugués **50** à **52** purs

3.2. Stabilité des ARNs en présence des biomolécules

Des dégradations de l'ARN ont eu lieu durant les réactions de conjugaison. Une hypothèse est de les imputer à la concentration élevée de molécules à coupler. Pour le vérifier, l'ARN **1** non modifié a été incubé avec les différentes biomolécules, exactement dans les mêmes conditions que lors de leurs réactions de conjugaison respectives. Le suivi des dégradations de l'ARN **1** en présence de chaque biomolécule a été effectué pendant 24 h par IEX-HPLC.

Des dégradations de **1** ont été observées dans les cas du thioglucose, du thiogalactose et de la 7-mercapto-4-méthylcoumarine. En effet, après 24 h, les proportions d'ARNs intacts sont respectivement de 33% pour le thioglucose, 54% pour le thiogalactose et 6% pour la 7-mercapto-4-méthylcoumarine, confirmant les hypothèses formulées lors des réactions de conjugaison. En particulier pour cette dernière, une très faible quantité d'ARN **1** est conservée intact après 24 h, indiquant une sensibilité importante à la 7-mercapto-4-méthylcoumarine libre en solution (**Figure 58**). A l'inverse, le glutathion engendre très peu de dégradation, avec 89% d'ARN **1** restant intact après 24 h.

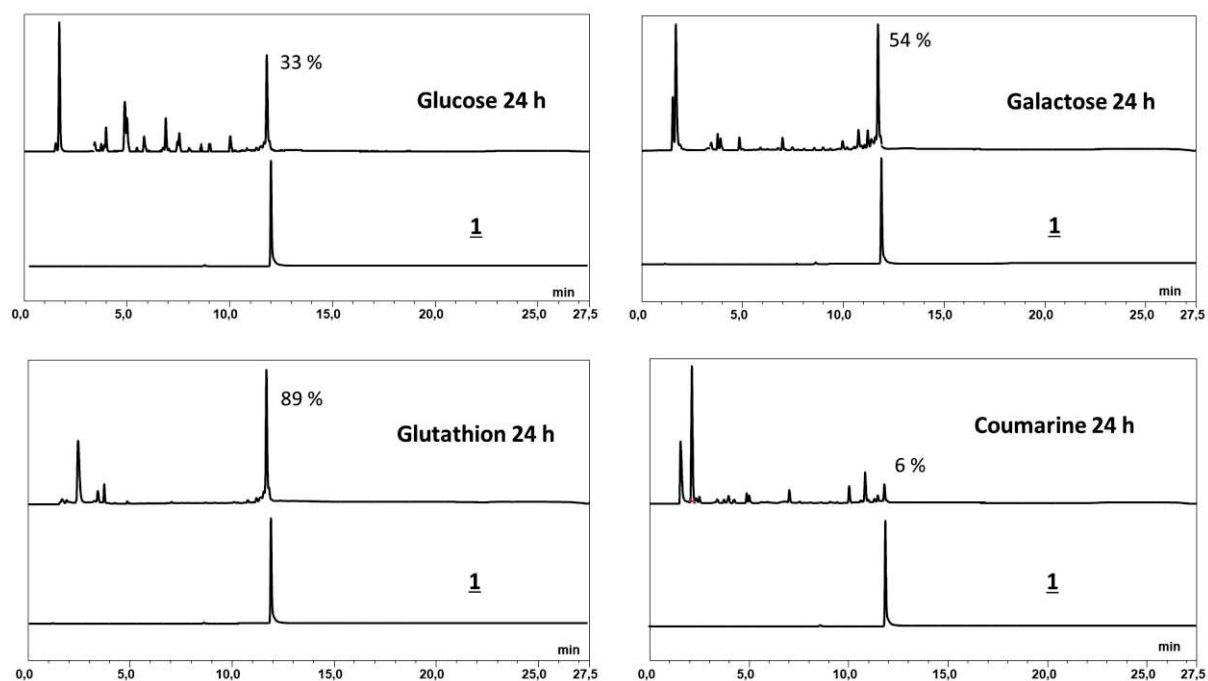


Figure 58 : Stabilité de l'ARN 1 après 24 h d'incubation en présence de thioglucose, de thiogalactose, de glutathion et de 7-mercapto-4-méthylcoumarine

Les dérivés de la doxorubicine 23, de la biotine 48 et de l'acide désoxycholique 49 ont été préalablement incubés pendant 2 h avec du TCEP pour générer le thiol correspondant avant addition de l'ARN 1 pour reproduire les conditions du couplage (**Figure 59**). Après 24 h, très peu de dégradations, respectivement 99%, 94% et 90% pour la biotine, la doxorubicine et l'acide désoxycholique, ont été observées. L'incubation a donc été poursuivie à 48 h et 72 h pour suivre l'évolution sur des temps plus longs. Dans le cas de la biotine, après 72 h, quelques traces de dégradation sont détectables mais 87% d'ARN 1 reste intact (**Figure 59**).

Avec la doxorubicine 23, les dégradations de l'ARN 1 restent limitées après 72 h, avec 62% d'ARN 1 intact. La stabilité de l'ARN est donc confirmée pendant les 5 min nécessaires à la réaction de couplage. En revanche, dans le cas de l'acide désoxycholique, de fortes dégradations sont identifiées après 72 h, laissant seulement 6% d'ARN 1 intact.

Ainsi, ces résultats semblent indiquer une plus grande sensibilité des ARNs à la coumarine et à l'acide désoxycholique libres.

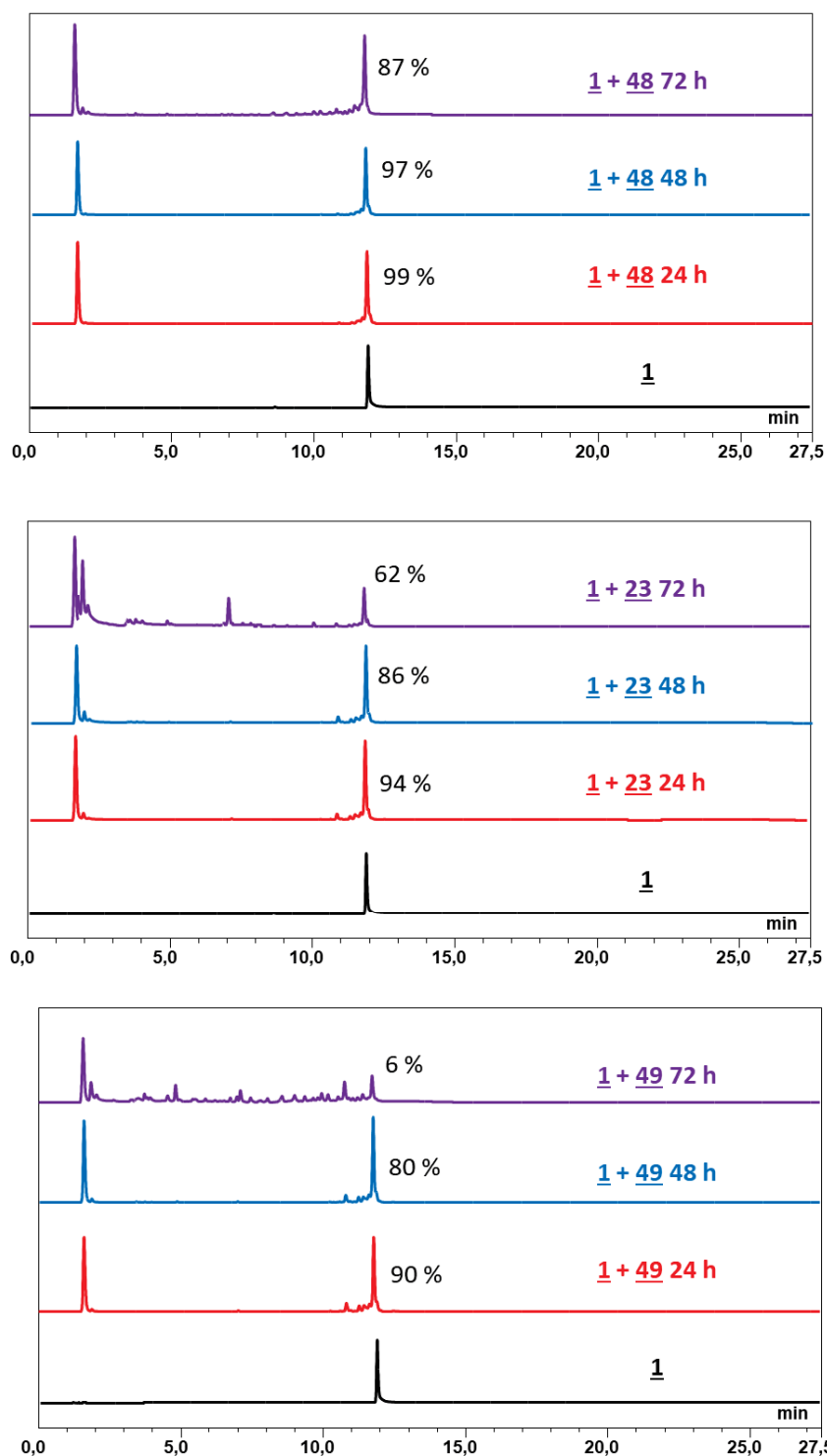


Figure 59 : Stabilité de l'ARN 1 pendant 72 h d'incubation en présence de biotine, de doxorubicine et d'acide désoxycholique

3.3. Synthèse d'un ARN conjugués avec deux biomolécules

Pour vérifier la flexibilité des deux méthodes de conjugaison A et B, il était intéressant d'introduire plusieurs biomolécules sur un ARN. Ainsi, un ARN comportant deux 2'-*O*-AcSEAC uridines a été synthétisé.

3.3.1. Synthèse d'un ARN contenant deux uridines 2'-O-PySSEAC

L'ARN modifié par deux groupements 2'-O-PySSEAC **53** (Tableau 18) a été synthétisé en suivant un protocole similaire à celui utilisé pour la synthèse de l'ARN **42**. Dans un premier temps, l'ARN a été assemblé sur support solide pour obtenir l'ARN supporté avec deux groupements 2'-O-AcSEAC. Les deux uridines à conjuguer avec les biomolécules ont été choisies sur des positions éloignées l'une de l'autre sur la séquence pour limiter les potentielles gênes stériques durant la réaction.

N°		m/z calculée	m/z obtenue ^a	ARN d'intérêt ^b (%)	Quantités isolées ^c (nmol)
53	5' GCA GCA GAA CCC U_{PySSEAC} UC UUA U_{PySSEAC} GA ^{3'}	7079,7	7079,5	18	19,9

Tableau 18 : Caractérisation de l'ARN **53**

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ([M-H])

^bPourcentage du pic de l'ARN d'intérêt en aire relative du chromatogramme IEX- HPLC du brut de déprotection à 260 nm

^cQuantités isolées après purification mesurées par spectrophotométrie à 260 nm à partir d'une synthèse à l'échelle de 1 μmol

L'obtention de l'ARN **53**, possédant les deux dérivés S-S-pyridine, a été réalisée sur support avec 2000 équivalents de 2,2'-dithiodipyridine, soit 1000 équivalents par modification, dans un mélange THF / BuNH₂ (3:1, v/v) pendant 15 min. L'ARN a ensuite été décroché du support solide et déprotégé sur les nucléobases et les 2'OH avec une solution d'ammoniaque pendant 3 h pour obtenir l'ARN **53** (Schéma 67).

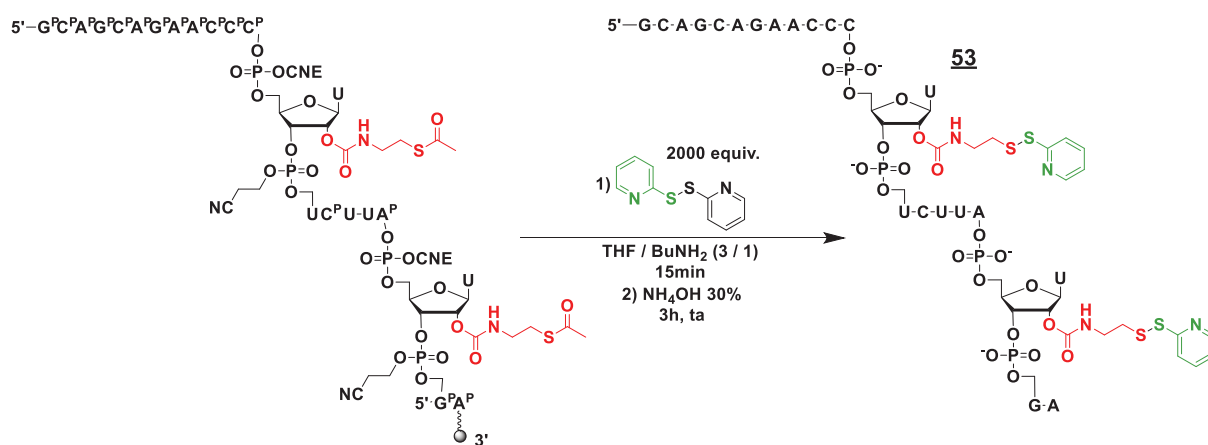


Schéma 67 : Synthèse de l'ARN **53** contenant deux modifications 2'-O-PySSEAC par transformation post-élongation de l'ARN 2'-O-AcSEAC

L'ARN brut **53** est présent à 18% sur le chromatogramme IEX-HPLC. Un large massif de pics avec des temps de rétention plus importants apparaît, indiquant la formation d'un mélange de dimères interbrins (Figure 60). En effet, les deux uridines 2'-substituées, situées proches de l'extrémité 3', sont incorporées en début d'élongation de l'ARN et sont donc aussi

présentes dans les avortons de synthèse. Lors de la réaction de formation des ARNs 2'-*O*-PySSEAC sur support solide, des liaisons disulfures interbrins entre les différents avortons de synthèse peuvent être formées. Après purification par IEX-HPLC, 19 nmol de l'ARN **53** ont été isolées et il a été caractérisé par spectrométrie de masse à 7079,5 Da (**Tableau 18**). L'analyse a révélé deux coupures sur le spectre de masse, correspondant à la rupture partielle d'un (6970,1 Da) ou deux ponts disulfures (6859,9 Da) lors du tir du laser (**Figure 60**).

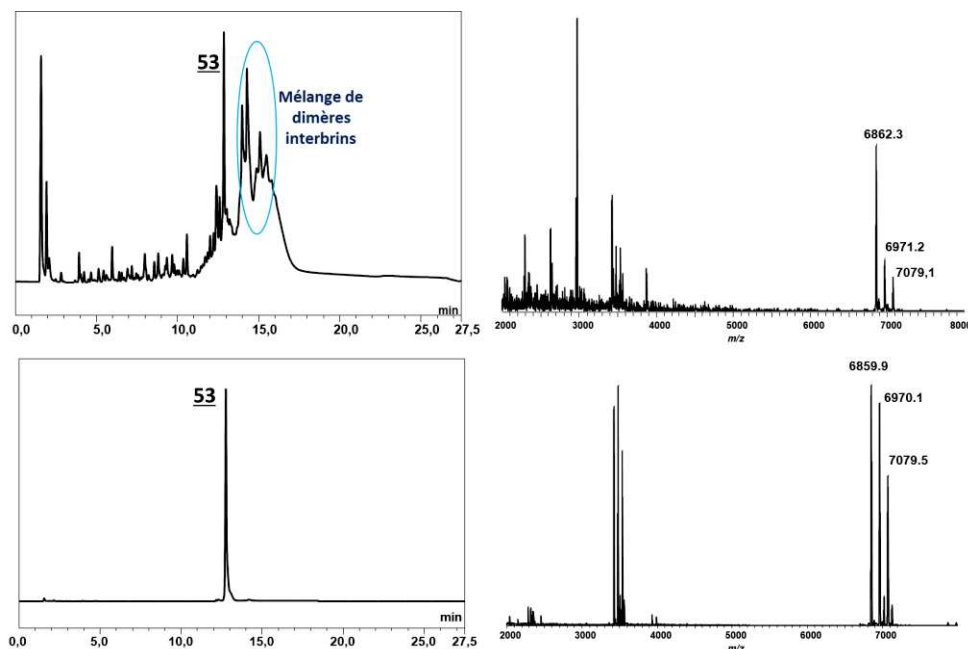


Figure 60 : Chromatogrammes IEX-HPLC et spectres de masse MALDI-TOF du brut de déprotection (en haut) et de l'ARN pur **53** (en bas)

3.3.2. [Couplage en solution des biomolécules](#)

Nous avons choisi de tester la conjugaison sur l'ARN **53** avec le 1-thio- β -D-galactose en utilisant la méthode A, pour obtenir l'ARN doublement modifié **54** et le dérivé de la doxorubicine **23**, en utilisant la méthode B, pour obtenir l'ARN **55** (**Tableau 19**). Les deux couplages ont été effectués dans les mêmes conditions décrites précédemment :

- Méthode A : 100 équivalents de 1-thio- β -D-galactose à 10 mM dans du tampon HEPES pH 8 pendant 24 h à 37 °C pour **54**.
- Méthode B : 20 équivalents de doxorubicine modifiée **23**, préalablement traitée pendant 2 h à 37 °C par 16 équivalents d'une solution de TCEP à 50 mM, pendant 5 min dans un mélange tampon HEPES pH 8 / DMF (1:1, v/v) pour **55**.

Conjugaison avec l'ARN <u>53</u> : 5'GCA GCA GAA CCC U _{PySSEAC} UC UUA U _{PySSEAC} GA ^{3'}						
N°		Méthode	m/z calculée	m/z obtenue ^a	Taux de conjugaison (%) ^b	Rendement de couplage (%) ^c
<u>54</u>	Galactose	A	7249,8	7249,6	28	17
<u>55</u>	Doxorubicine	B	8152,6	8152,9	71	38

Tableau 19 : Résultats et caractérisation des ARNs conjugués 54 et 55 portant deux biomolécules (galactose ou doxorubicine)

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ([M-H])

^bPourcentage du pic de l'ARN d'intérêt en aire relative du chromatogramme IEX- HPLC ou RP-HPLC du brut de déprotection à 260 nm

^cRendement calculé à partir des quantités de produit pur déterminées par spectrophotométrie à 260 nm pour 54, à 481 nm pour 55

Dans le cas du galactose, l'ARN 54 a été obtenu en faible proportion à 28% (**Tableau 19, Figure 61**). En effet, le pic majoritaire du chromatogramme, présent à 70% et avec un temps de rétention supérieur, correspond à un ARN avec deux modifications sous forme thiol. La présence de deux thiol libres et/ou la formation potentielle d'un pont disulfure intrabrin entre les deux uridines, peut expliquer un rendement en produit isolé de seulement 17% après purification. En effet, par spectrométrie de masse MALDI-TOF, la distinction d'un ARN portant deux espèces thiols libres et l'espèce cyclique potentielle est impossible car ils possèdent la même masse.

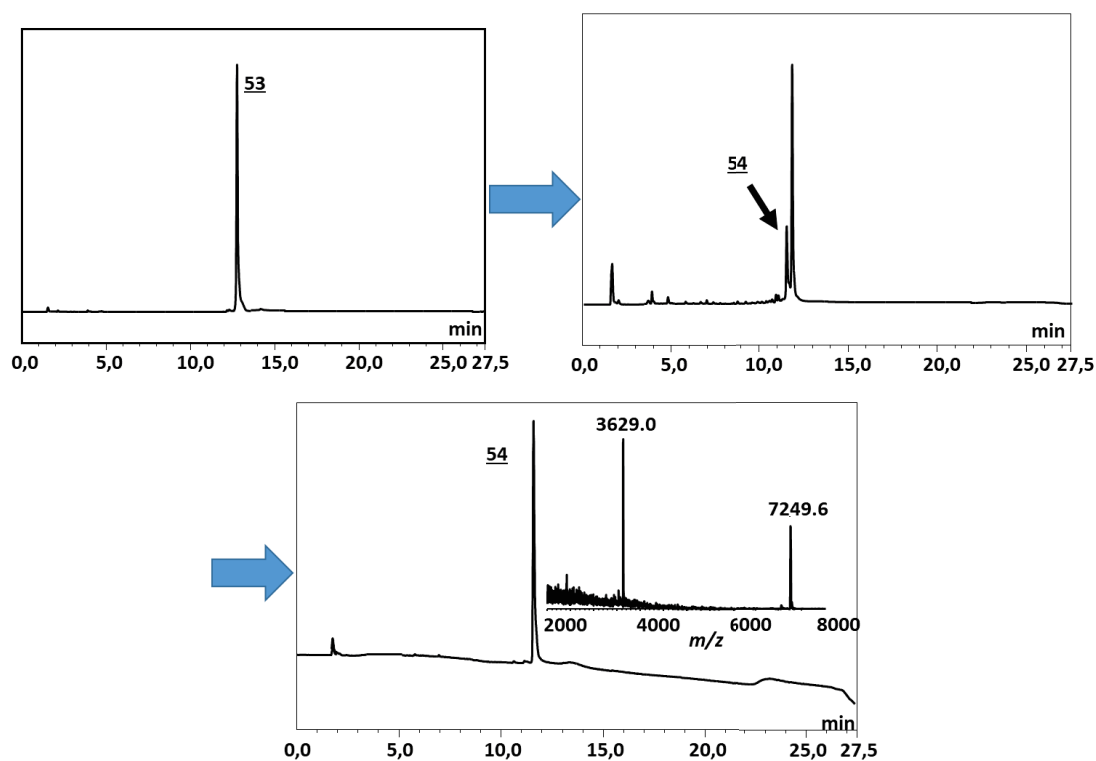


Figure 61 : Chromatogramme IEX-HPLC du brut de couplage (en haut à droite) et chromatogramme IEX-HPLC et spectre de masse MALDI-TOF (en bas) de l'ARN couplé pur 54 à partir de l'ARN 53

Pour l'ARN **55** couplé à deux molécules de doxorubicine, comme pour l'ARN conjugué à une seule molécule de doxorubicine (**51**), le taux de conjugaison de 71% est élevé, permettant de récupérer 38% de l'ARN d'intérêt **55** après purification (**Tableau 19, Figure 62**). Cette différence d'efficacité de couplage entre les ARNs **54** et **55** peut s'expliquer par la cinétique rapide (5 min) de la réaction avec la doxorubicine, évitant ainsi la présence de thiols libres dans le milieu de la réaction ou la formation d'une liaison disulfure intramoléculaire.

Bien que les résultats soient contrastés, ils confirment la possibilité de multi-conjugaison de biomolécules sur des ARNs en position 2' de ribonucléotides. Il reste néanmoins à optimiser les conditions pour augmenter les rendements de réaction.

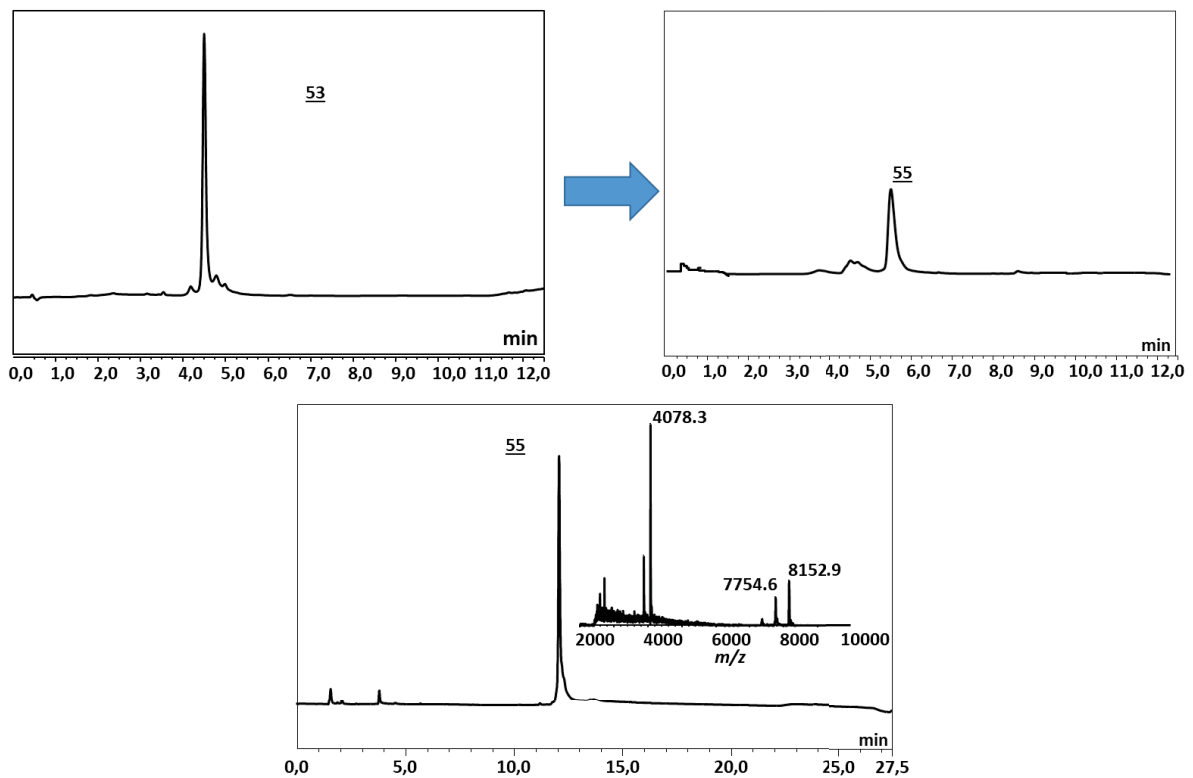


Figure 62 : Chromatogramme HPLC phase inverse du brut de couplage (en haut à droite) et chromatogramme IEX-HPLC et spectre de masse MALDI-TOF (en bas) de l'ARN pur **55** à partir de l'ARN **53**

4. Devenir des ARNs conjugués en présence de glutathion

L'intérêt de la conjugaison avec des ponts disulfures réside dans la possibilité de libérer les molécules conjuguées en milieu réducteur, pour engendrer une réponse biologique et/ou récupérer le siARN actif.

Les ARNs **43**, **44**, **45**, **46**, **50**, **51** et **52**, conjugués avec respectivement un glucose, un galactose, un glutathion, une coumarine, une biotine, une doxorubicine et un acide désoxycholique, ont été incubés avec 5,6 mM de glutathion dans du tampon HEPES à pH 8 à 37 °C pendant 24 h. Des prélèvements ont été réalisés à différents temps pour suivre les cinétiques de libération des biomolécules, et les analyses ont été effectuées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (**Figure 63 -Figure 65**).

Toutes les cinétiques montrent la rupture rapide du pont disulfure. La totalité du produit de départ a disparu après 5 min de réaction au profit de l'espèce thiol stable, dont la masse est 6758 Da. Ces résultats confirment la libération des molécules d'intérêt en milieu réducteur. Après coupure du pont disulfure, le devenir des ARNs conjugués est différent. En effet, les spectres de masse MALDI-TOF obtenus ne montrent aucune trace de dégradations des ARNs **45**, **50** et **51** respectivement couplés au glutathion, à la doxorubicine et à la biotine (**Figure 63**). Ce résultat est cohérent avec les tests décrits au paragraphe 3.2, ces trois molécules n'ayant pas engendré de dégradations majeures sur les ARNs.

Néanmoins, il est à noter, sur les spectres de masse après 6 h de réaction, la présence d'un pic supplémentaire à 7066 Da qui correspond à la conjugaison de l'ARN à une molécule de glutathion. Une hypothèse est que le thiol porté par l'ARN attaque ensuite le pont disulfure du glutathion oxydé formé après plusieurs heures (**Schéma 68**).

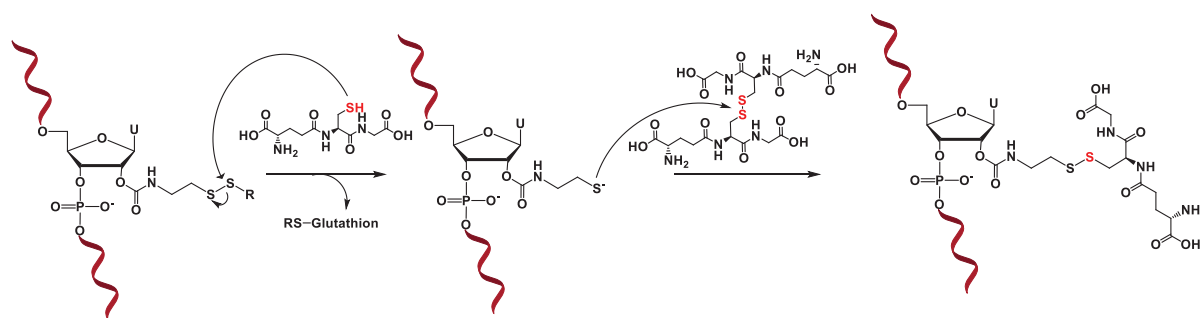


Schéma 68 : Mécanisme potentiel de libération des biomolécules suivi d'un nouveau couplage de l'ARN sous forme thiol au glutathion

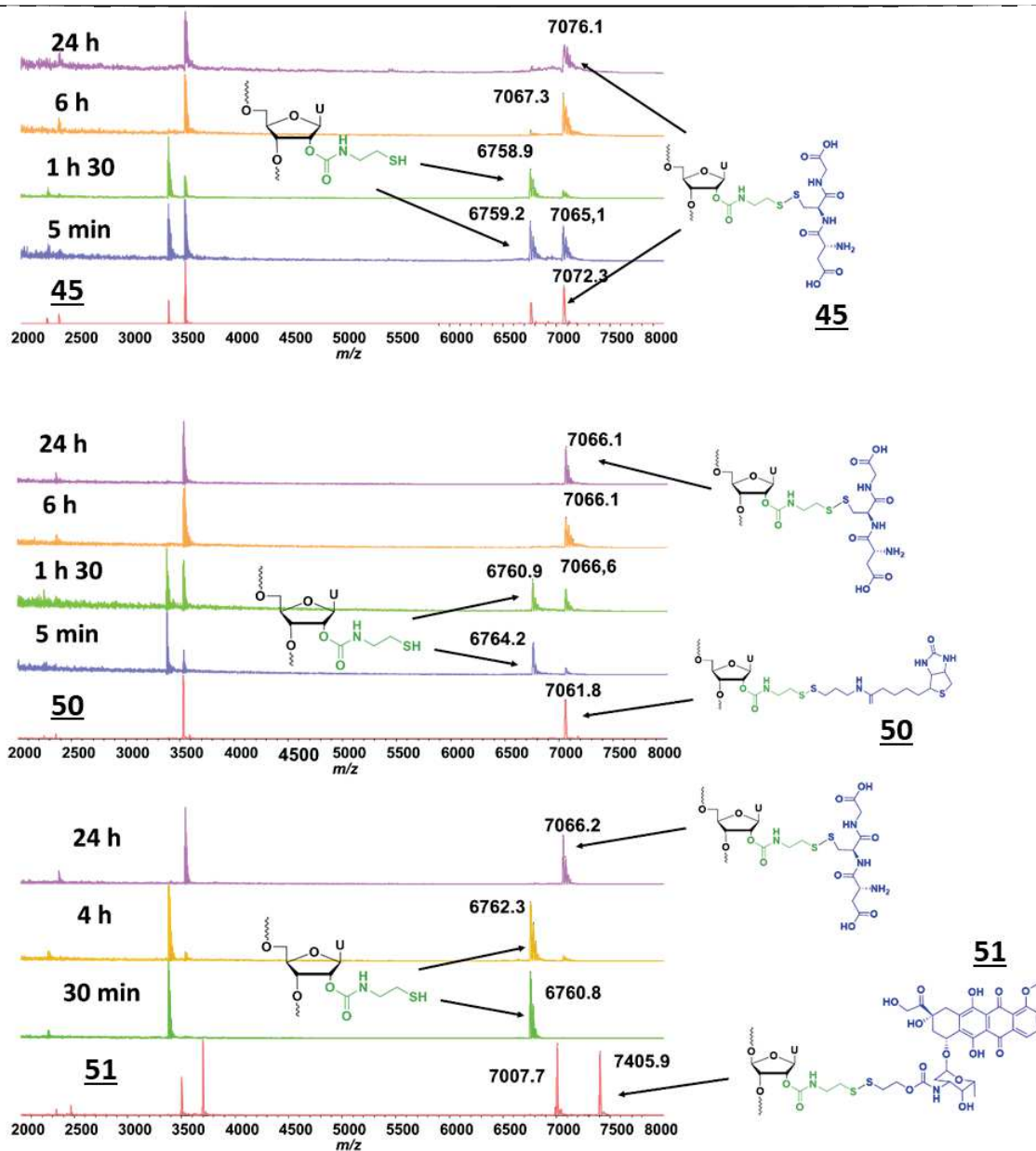


Figure 63 : Suivi par spectrométrie de masse MALDI-TOF du devenir des ARNs conjugués **45**, **50** et **51** en présence de glutathione

Lors des cinétiques sur les ARNs **43** et **44**, couplés au glucose et au galactose, de faibles dégradations sont visibles après 6 h ou 24 h (**Figure 64**). La fixation du glutathione est une nouvelle fois observée, après 6 h pour le glucose et seulement 1 h 30 pour le galactose.

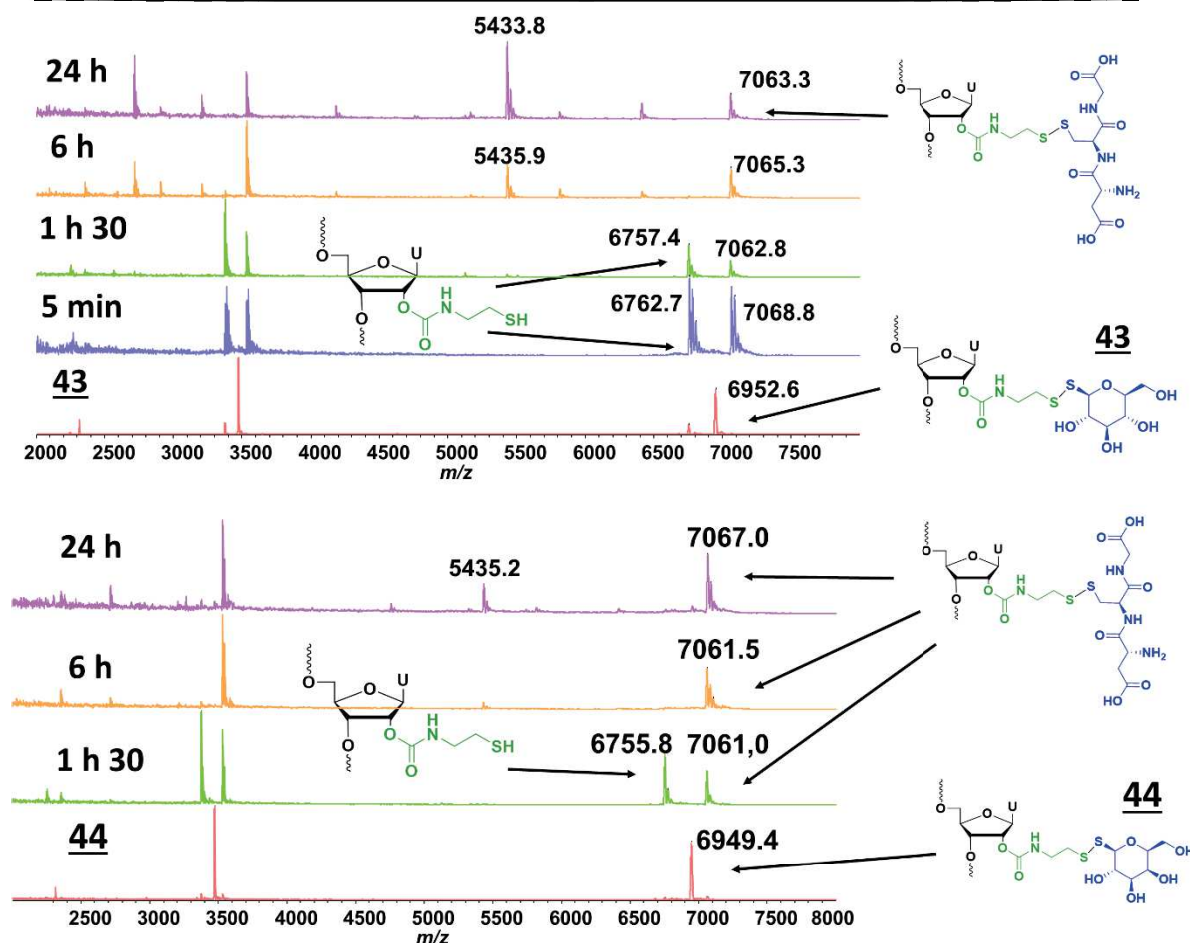


Figure 64 : Suivi par spectrométrie de masse MALDI-TOF du devenir des ARNs conjugués **43** et **44** en présence de glutathione

A l'inverse, pour les ARNs **46** et **52** conjugués respectivement avec la 7-mercapto-4-méthylcoumarine et l'acide désoxycholique, une forte dégradation est constatée (**Figure 65**). En effet, après 24 h, la totalité de l'ARN a été dégradée sous l'effet des composés libérés (détection de pics de masse d'environ 5435 Da). Cet effet est similaire à celui observé sur l'ARN naturel pour ces deux biomolécules (paragraphe 3.2). La conjugaison du glutathione est une nouvelle fois observée sur les spectres à 1 h 30 et 6 h, puis n'est plus identifiable ensuite en raison de la dégradation de l'ARN.

Ces résultats confirment donc la libération des biomolécules conjuguées en milieu réducteur.

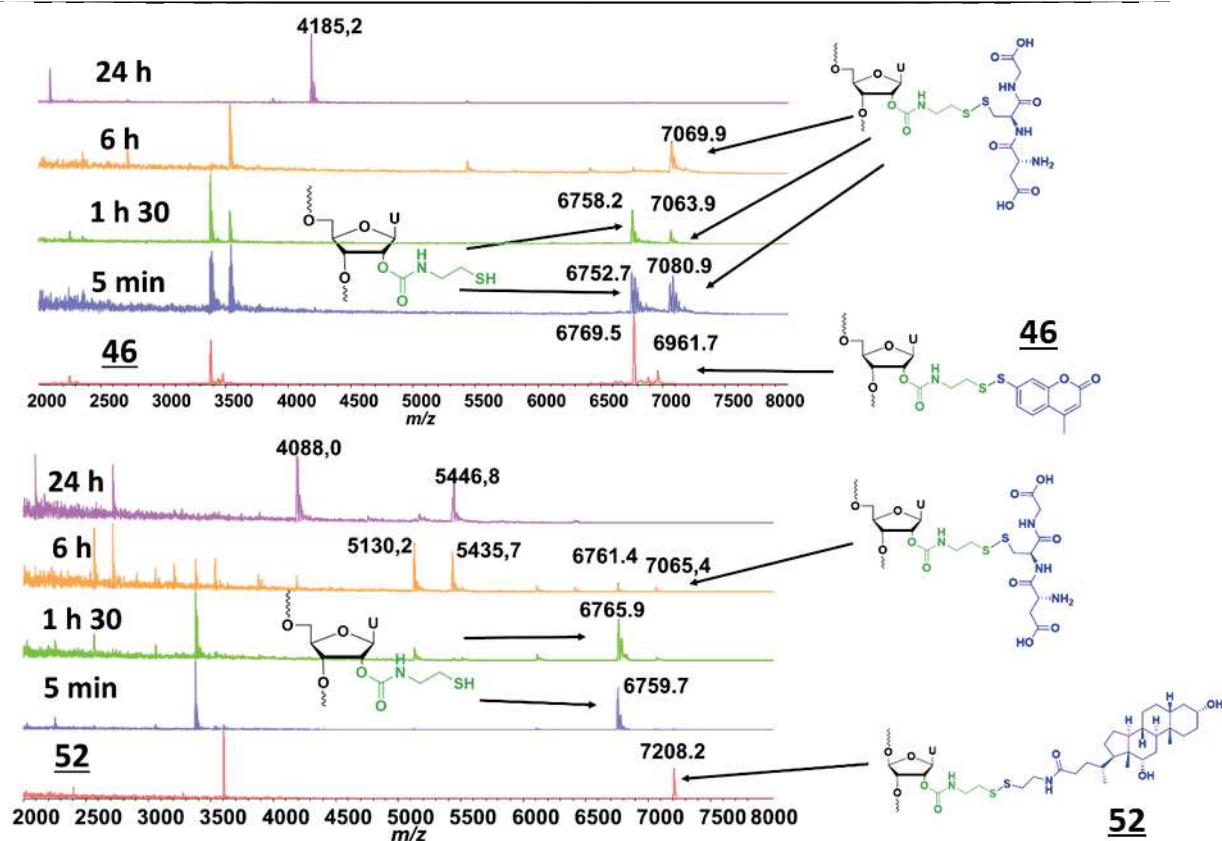


Figure 65 : Suivi par spectrométrie de masse MALDI-TOF du devenir des ARNs conjugués **46** et **52** en présence de glutathion

5. Bilan des méthodes de conjugaison

Nous avons développé deux méthodes de conjugaison d'ARNs par sept molécules différentes. Ces méthodes permettent d'introduire une grande variété de biomolécules, contrairement aux travaux précédents décrits par S. Obika²³² et T. Oretskaya²⁰⁴, avec une efficacité comprise entre 37% et 63% (**Tableau 20**).

Lors des réactions de conjugaison en position 6' réalisées par S. Obika *et al.*, des rendements compris entre 43% et 70% ont été obtenus pour les dérivés peptidiques. Ces résultats sont légèrement supérieurs aux 42% obtenus pour le glutathion par notre méthode. En revanche, notre méthode est beaucoup plus efficace pour fixer des composés lipophiles. Un rendement d'uniquement 10% a été obtenu par S. Obika avec le cholestérol contre au minimum 36% pour les composés lipophiles au cours de nos travaux. Notre méthode apparaît donc plus efficace pour des molécules lipophiles, et plus homogène pour introduire une grande variété de composés.

De plus, notre stratégie a permis la synthèse d'ARNs possédant deux sites de conjugaison sous la forme *S-S*-pyridine, confirmant la possibilité de multi-conjugaison, au contraire des études publiées précédemment. Les méthodes de conjugaison que nous avons

Chapitre III : Conjugaison d'ARNs à des biomolécules *via* un lien *N*-disulfanyléthylcarbamate en position 2' de l'uridine

développées peuvent donc être utilisées de façon complémentaire, en fonction de la disponibilité des molécules commerciales sous forme thiol.

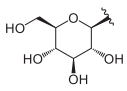
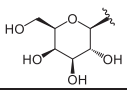
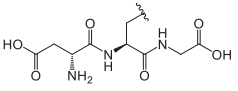
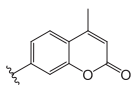
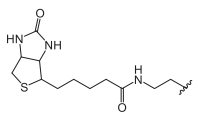
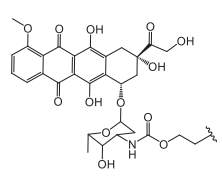
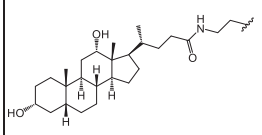
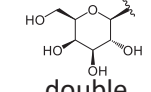
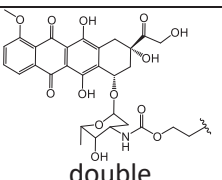
N°		Méthode couplage	Conditions	Taux de conjugaison (%)	Rendement (%)
<u>43</u>		A	Tampon HEPES pH 8 24 h	63	37
<u>44</u>		A	Tampon HEPES pH 8 24 h	85	46
<u>45</u>		A	Tampon HEPES pH 8 24 h	70	42
<u>46</u>		A	Tampon HEPES pH 8 / DMF (1:1, v/v) 24 h	72	46
<u>50</u>		B	Tampon HEPES pH 8 / DMF (3:1, v/v) 24 h	89	46
<u>51</u>		B	Tampon HEPES pH 8 / DMF (1:1, v/v) 5 min	88	63
<u>52</u>		B	Tampon HEPES pH 8 / DMF (7:3, v/v) 24 h	42	36
<u>54</u>	 double modification	A	Tampon HEPES pH 8 24 h	28	17
<u>55</u>	 double modification	B	Tampon HEPES pH 8 / DMF (1:1, v/v) 5 min	71	38

Tableau 20 : Bilan des réactions de conjugaison

6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit une nouvelle stratégie de conjugaison d'ARNs avec des biomolécules en utilisant la chimie des ponts disulfures.

Dans ce but, le synthon 2'-*O*-AcSEAC uridine phosphoramidite, portant en position 2' un lien carbamate, a été synthétisé en six étapes à partir de la 3',5'-*O*-TIPS-uridine avec un rendement global de 51%. Cette chaîne a ainsi été utilisée pour obtenir, par une transformation post-élongation sur support, un ARN 2'-*O*-PySSEAC, plateforme pour la conjugaison d'une large gamme de composés. Des ARNs comportant une ou deux uridines sous forme disulfanylpyridine ont ainsi été isolés.

La conjugaison a ensuite été effectuée en solution en utilisant deux méthodes complémentaires, dépendant de la présence ou l'absence d'une fonction thiol sur la molécule disponible dans le commerce. Ainsi, le thioglucose, le thiogalactose, le glutathion et la 7-mercapto-4-méthylcoumarine ont été conjugués directement sur l'ARN activé disulfanylpyridine. L'autre méthode a consisté en la modification préalable des biomolécules à coupler par un lien portant un résidu S-S-pyridyl. Ensuite, la conjugaison de la biotine, de la doxorubicine et de l'acide désoxycholique ainsi modifiés a été menée en deux étapes. La réduction du pont disulfure de la biomolécule avec du TCEP a libéré le thiol qui a ensuite réagi sur l'ARN 2'-*O*-PySSEAC et formé le lien disulfure. Par ces méthodes, nous avons aussi conjugué deux biomolécules sur un ARN. Les conditions de réaction, tels que le nombre d'équivalents ou les caractéristiques du tampon, nécessitent malgré tout d'être optimisées pour effectuer de la multi-conjugaison avec des rendements plus élevés. En effet, l'exemple de la conjugaison avec une seule molécule de doxorubicine, pour laquelle le nombre d'équivalents a été réduit de 80%, démontre la possibilité d'optimiser les conditions de couplage.

Enfin, nous avons montré que les biomolécules étaient libérées en milieu réducteur. Ce résultat confirme l'intérêt de notre approche pour introduire des molécules d'intérêt pour l'adressage ou la délivrance cellulaire.

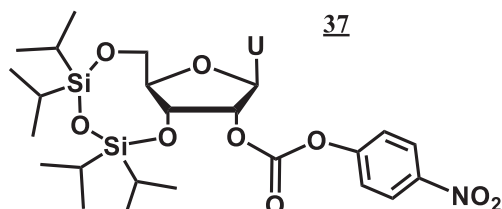
De plus, la réactivité de cette fonction thiol libre permanente positionnée en 2' d'ARN est également intéressante car elle ouvre des perspectives pour l'étude de systèmes réversibles. En effet, l'utilisation potentielle de cette modification de façon dynamique, pour fixer ou libérer des molécules en fonction des conditions extérieures, pourrait s'avérer avantageuse pour ouvrir de nouveaux axes de recherche.

7. Partie expérimentale

General experimental procedures

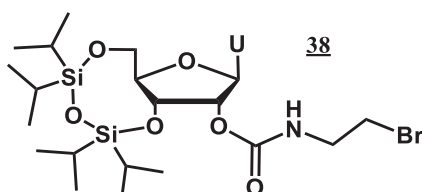
The general experimental procedures are described in the experimental section of chapter II.

2'-O-(4-nitrophenoxycarbonyl)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl) uridine **37**



A solution of 3',5'-O-(tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl) uridine (5.00 g, 10.28 mmol, 1.00 equiv) in dry toluene (100 mL) was treated under argon with pyridine (0.82 mL, 10.28 mmol, 1.00 equiv) and 4-nitrophenyl chloroformate (2.38 g, 11.82 mmol, 1.15 equiv). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. Then, pyridine (0.15 mL, 2.06 mmol, 0.20 equiv) and 4-nitrophenyl chloroformate (0.475 g, 2.06 mmol, 0.20 equiv) were added. After stirring at room temperature for 2 h, the mixture was diluted in EtOAc and washed with water. The aqueous layer was then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography with cyclohexane / EtOAc (7:3, v/v). The desired compound **37** was obtained as white foam (5.4 g, 8.2 mmol, 81%). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):** δ = 9.14 (s, 1 H, NH), 8.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H, Ph), 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, H₆), 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H, Ph), 5.94 (s, 1 H, H_{1'}), 5.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, H₅), 5.32 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H, H_{2'}), 4.47 (dd, *J* = 9.2 Hz, *J* = 3.6 Hz, 1 H, H_{3'}), 4.26 (d, *J* = 10.0 Hz, 1 H, H_{5'}), 4.11 (d, *J* = 3.6 Hz, 1 H, H_{4'}), 4.02 (d, *J* = 10.2 Hz, 1 H, H_{5'}), 1.10-0.98 (m, 28 H, iPr) ppm. **¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz):** δ = 163.0, 155.4, 151.4, 149.8, 145.5, 139.0, 125.4, 121.7, 102.4, 88.0, 82.0, 80.2, 67.8, 59.1, 17.4 - 16.7 (8 C), 13.8 - 12.5 (4 C) ppm. **HRMS (ESI⁺):** *m/z* calcd. for C₂₈H₄₂N₃O₁₁Si₂: 652.2358 [M+H]⁺, found 652.2365.

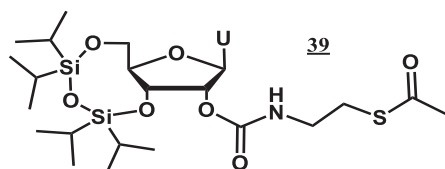
2'-O-(2-bromoethylaminocarbonyl)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl) uridine **38**



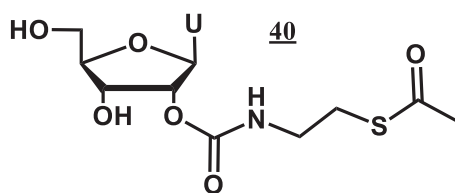
A solution of compound **37** (2.38 g, 3.65 mmol, 1.00 equiv) in dry pyridine (36.5 mL) was treated under argon with 2-bromoethylamine hydrobromide (0.897 g, 4.38 mmol, 1.2 equiv) and dry triethylamine (0.5 mL, 7.3 mmol, 2 equiv). After stirring at room temperature for 4 h,

the mixture was diluted in EtOAc and washed with water. The aqueous layer was then extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography with a step gradient of DCM and EtOAc (10-30%). The desired compound **38** was obtained as white foam (2.27 g, 3.57 mmol, 98%). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):** δ = 9.23 (s, 1 H, NH), 7.65 (d, *J* = 4.1 Hz, 1 H, H₆), 5.83 (s, 1 H, H_{1'}), 5.69 (dd, *J* = 4.1 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1 H, H₅), 5.67 (t, *J* = 5.5 Hz, 1 H, NH), 5.27 (d, *J* = 5.1 Hz, 1 H, H_{2'}), 4.35 (dd, *J* = 5.1 Hz, *J* = 3.1 Hz, 1 H, H_{3'}), 4.19 (d, *J* = 7.1 Hz, 1 H, H_{5'}), 3.99-3.96 (m, 2 H, H_{5'}, H_{4'}), 3.66-3.51 (m, 2 H, CH₂), 3.45 (t, *J* = 5.3 Hz, 2 H, CH₂), 1.08-0.99 (m, 28 H, iPr) ppm. **¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz):** 163.2, 154.4, 149.7, 139.3, 102.2, 88.5, 82.1, 76.1, 67.9, 59.7, 42.8, 32.2, 16.7-17.4 (8 C), 12.5-13.4 (4 C) ppm. **HRMS (ESI⁺):** *m/z* calcd for C₂₄H₄₂BrN₃O₈Si₂ [M+H]⁺: 636.1772, Found 636.1779.

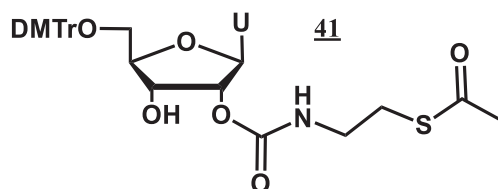
2'-O-(2-acetylthio-ethylaminocarbonyl)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl) uridine **39**



Compound **38** (4.2 g, 6.6 mmol, 1.00 equiv) was dissolved under argon in dry acetonitrile (132 mL) at 40°C. The solution was treated with potassium thioacetate (1.12 g, 9.9 mmol, 1.5 equiv) and 18-C-6 (0.871 g, 3.3 mmol, 0.5 equiv). After stirring at room temperature overnight, the mixture was diluted in EtOAc and washed with water. The aqueous layer was then extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with brine and dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography with a step gradient of DCM and EtOAc (0-20%). The desired compound **39** was obtained as white foam (3.36 g, 5.32 mmol, 80%). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):** δ = 8.68 (s, 1 H, NH), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H, H₆), 5.80 (s, 1 H, H_{1'}), 5.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, H₅), 5.25 (d, *J* = 4.4 Hz, 1 H, H_{2'}), 5.14 (s, 1 H, NH), 4.36 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 5.4 Hz, 1 H, H_{3'}), 4.18 (d, *J* = 11.1 Hz, 1 H, H_{5'}), 4.00-3.95 (m, 2 H, H_{5'}, H_{4'}), 3.37-3.35 (m, 2 H CH₂), 3.00 (t, *J* = 6.1 Hz, 2 H, CH₂), 2.34 (s, 3 H, CH₃), 1.08-0.95 (m, 28 H, iPr) ppm. **¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz):** 195.8, 162.8, 154.5, 149.5, 139.5, 102.2, 88.7, 82.1, 75.3, 68.0, 53.4, 40.9, 30.6-30.9, 29.6, 16.0 - 17.4 (8C), 12.6 - 13.4 (4C) ppm. **HRMS (ESI⁺):** *m/z* calcd for C₂₆H₄₆N₄O₈SSi₂ [M+H]⁺: 632.2493, Found 632.2493.

2'-O-(2-acetylthio-ethylaminocarbonyl) uridine 40

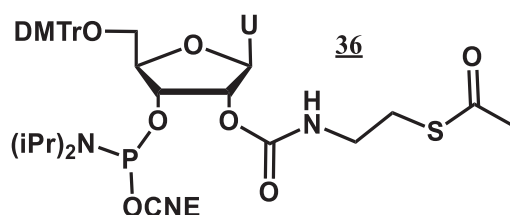
Compound **39** (3.36 g, 5.3 mmol, 1.00 equiv) was dissolved under argon in dry THF (74.5 mL). The solution was treated dropwise with triethylamine trihydrofluoride (1.7 mL, 10.6 mmol, 2 equiv). After stirring 4 h at room temperature, the deprotection was complete and the reaction mixture was treated with triethylammoniumacetate buffer (2 M, pH 7), then co-evaporated with water and acetonitrile. The crude material was purified by silica gel column chromatography with DCM and MeOH (95:5, v/v). The desired compound **40** was obtained as white foam (1.9 g, 4.88 mmol, 92%). $^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ = 11.32 (s, 1 H, NH), 7.89 (d, J = 8.1 Hz, 1 H, H_6), 7.50 (t, J = 6.0 Hz, 1 H, NH), 5.97 (d, J = 6.3 Hz, 1 H, $\text{H}_{1'}$), 5.66 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, H_5), 5.47 (t, J = 5.2 Hz, 1 H, OH), 5.18 (t, J = 4.6 Hz, 1 H, $\text{H}_{2'}$), 5.02 (t, J = 5.7 Hz, J = 5.1 Hz, 1 H, $\text{H}_{3'}$), 4.19 (dd, J = 8.5 Hz, J = 4.9 Hz, 1 H, $\text{H}_{4'}$), 3.88 (d, J = 3.0 Hz, 1 H, OH), 3.65-3.54 (m, 2 H, $\text{H}_{5'} + \text{H}_{5''}$), 3.25-3.09 (m, 2 H, CH_2), 2.94-2.84 (m, 2 H, CH_2), 2.31 (s, 3 H, CH_3) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO-d_6 , 100 MHz): 195.6, 163.5, 155.6, 151.0, 141.1, 102.6, 86.2, 85.9, 75.2, 69.4, 61.4, 40.9, 31.0, 28.8 ppm. HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$]⁺: 390.0971, Found 390.0972.

2'-O-(2-acetylthio-ethylaminocarbonyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) uridine 41

Compound **40** (0.532 g, 1.37 mmol, 1 equiv) was dried for 24 h under reduced pressure, then was dissolved under argon in dry pyridine (2.6 mL) at room temperature. After complete dissolution, dry DCM (13.7 mL) was added. The solution was treated with *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (263 μL , 1.51 mmol, 1.1 equiv) and dimethoxytrityl chloride (DMTrCl) (559 mg, 1.65 mmol, 1.2 equiv) added in small portions over 1 h. After 2 h and 6 h, DIEA and DMTrCl (0.5 and 0.2 equiv respectively) were added to the reaction. Completion was reached after 7 h, the mixture was diluted in DCM and poured into saturated NaHCO_3 solution. The aqueous layer was then extracted with DCM. The combined organic extracts were washed with brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was removed under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography with DCM and pyridine (99:1, v/v), then DCM with MeOH (1-5%). The desired compound **41** was obtained as pale yellow foam (980 mg, 1.34 mmol, 98%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 9.36 (s, 1 H, NH), 7.75 (d, J = 8.2 Hz, 1 H, H_6), 7.40-7.16 (m, 9 H, H_{Ar}), 6.84 (d, J = 8.9 Hz, 4 H, H_{Ar}), 6.17 (d, J = 5.1

Hz, 1 H, H_{1'}), 5.80 (t, $J = 6.1$ Hz, 1 H, NH), 5.34 (dd, $J = 8$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 1 H, H₅), 5.24 (t, $J = 5.1$ Hz, 1 H, H_{2'}), 4.67 (dd, $J = 7.6$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 1 H, H_{3'}), 4.17 (d, $J = 3.1$ Hz, 1 H, H_{4'}), 3.79 (s, 6 H, OCH₃), 3.58-3.51 (m, 1 H, H_{5'}), 3.57-3.48 (m, 2 H, H_{5''}+ HCH), 2.89-3.25 (m, 1 H+2 H, HCH+ CH₂), 2.15 (s, 3 H, CH₃) ppm. **¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz)**: 196.9, 163.3, 158.7, 155.4, 150.7, 144.2, 140.2, 137.9, 135.9, 135.0, 130.2, 130.2, 130.0, 129.1, 129.1, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1, 127.2, 125.3, 113.4, 113.3, 102.8, 87.2, 86.0, 84.1, 70.3, 62.8, 55.3, 55.3, 41.2, 28.8, 21.5 ppm. **HRMS (ESI⁺)**: m/z calcd for C₃₅H₃₈N₃O₁₀S [M+H]⁺: 692.22, Found 692.2283.

2'-O-(2-acetylthio-ethylaminocarbonyl)-3'-O-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl) uridine 36

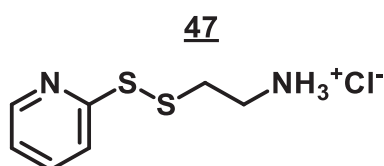


Compound 41 (0.850 g, 1.23 mmol, 1 equiv) was dissolved under argon in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL) previously passed through an alumina column under argon. A mixture of DIEA (386 μL, 2.21 mmol, 1.8 equiv) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (437 μL, 1.95 mmol, 1.5 equiv) in CH₂Cl₂ (2.3 mL) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. DIEA (129 μL, 0.74 mmol, 0.6 equiv) and 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (137 μL, 0.65 mmol, 0.5 equiv) in CH₂Cl₂ (2.3 mL) was added dropwise, and the reaction was stirred at room temperature for 2 h. Then, the mixture was diluted with EtOAc and washed with a saturated NaCl / NaHCO₃ solution (1:1, v/v). The aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by silica gel column chromatography with an isocratic elution of CH₂Cl₂ / EtOAc (4:6, v/v) containing 1% pyridine. The desired compound 36 was obtained as a white foam (975 mg, 1.09 mmol, 89%) as two diastereoisomers. **³¹P-NMR (CDCl₃, 162 MHz)**: $\delta = 150.67, 150.19$ ppm. **HRMS (ESI⁺)**: m/z calcd for C₄₄H₅₄N₅O₁₁PS [M+H]⁺: 892.33, Found 892.3345.

(2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethylcarbamate)doxorubicine 23

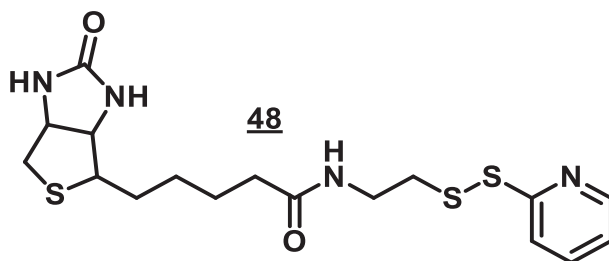
The synthesis of doxorubicine (2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethylcarbamate)doxorubicin 23 was described in the experimental section of chapter II.

2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethan-1-amine 47

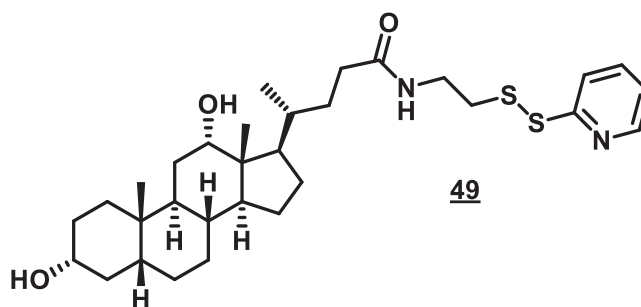


To a stirred solution of 2,2'-dithiodipyridine (2.9 g, 13.2 mmol, 1.5 equiv) in dry MeOH (32 mL) under argon was added dropwise a solution of cysteamine hydrochloride (1.0 g, 8.8 mmol, 1 equiv) in dry MeOH (12 mL). The yellow mixture was stirred at room temperature for 2.5 h. The solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by silica gel column chromatography with a step gradient of DCM and MeOH (0-10%). The desired compound **47** was obtained as pale yellow solid (1.4 g, 7.6 mmol, 86%). **¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz):** δ = 8.50 (ddd, J = 4.8 Hz, J = 1.8 Hz, J = 0.9 Hz, 1 H, H_{pyridyl}), 8.32 (s, 2 H, NH₂), 7.83 (td, J = 8.1 Hz, J = 1.9 Hz, 1 H, H_{pyridyl}), 7.74 (td, J = 8.1 Hz, J = 0.9 Hz, 1 H, H_{pyridyl}), 7.28 (ddd, J = 7.3 Hz, J = 4.8 Hz, J = 1.0 Hz, 1 H, H_{pyridyl}), 3.16-3.04 (m, 4 H, 2 CH₂) ppm. **¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz):** 158.6, 150.3, 138.4, 122.1, 120.6, 38.3, 35.4 ppm. **HRMS (ESI⁺):** m/z calcd for C₇H₁₁N₂S₂ [M+H]⁺: 187.0364, Found 187.0348.

(+) -Biotin *N*-2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethylamide **48**



A solution of (+) -biotin-*N*-hydroxysuccinimide ester (0.477 g, 1.4 mmol, 1.3 equiv) in DMF (5.8 mL) was added to a solution containing compound **47** (0.200 g, 1.07 mmol, 1 equiv), triethylamine (3 mL, 21.5 mmol, 15.3 equiv), H₂O (2.85 mL) and CH₃CN (5.7 mL). The mixture was stirred for 3 h at room temperature. The solvent was evaporated under vacuum. The crude material was purified by silica gel column chromatography with a step gradient of DCM and MeOH (0-20%). The desired compound **48** was obtained as a white solid. (205 mg, 0.50 mmol, 47%). **¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz):** δ = 8.47-8.45 (m, 1 H, H_{pyridyl}), 8.02 (t, J = 5.6 Hz, 1 H, NH), 7.82 (td, J = 8.1 Hz, J = 1.8 Hz, 1 H, H_{pyridyl}), 7.76-7.75 (m, 1 H, H_{pyridyl}), 7.24 (ddd, J = 7.3 Hz, J = 4.7 Hz, J = 1.0 Hz, 1 H, H_{pyridyl}), 6.41 (s, 1 H, NH), 6.35 (s, 1 H, NH), 4.31-4.28 (m, 1 H, CH), 4.13-4.10 (m, 1 H, CH), 3.32-3.30 (m, 2 H, CH₂N), 3.10-3.07 (m, 1 H, CH), 2.89 (t, J = 6.9 Hz, 2 H, CH₂-CO), 2.80 (dd, J = 12.3 Hz, J = 5.1 Hz, 1 H, CH-HCH-S), 2.57 (d, J = 12.5 Hz, 1 H, CH-HCH-S), 2.06 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, CH₂-CH₂-S), 1.64-1.41 (m, 4 H, 2 CH₂), 1.35-1.23 (m, 2 H, 1 CH₂) ppm. **¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz):** 172.7, 163.2, 159.6, 150.1, 138.3, 121.7, 119.7, 61.5, 59.7, 55.9, 40.3, 38.2, 38.0, 35.6, 28.6, 28.5, 25.7 ppm. **HRMS (ESI⁺):** m/z calcd for C₁₇H₂₅N₄O₂S₃ [M+H]⁺: 413.1140, Found 413.1142.

N*-(2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl)-3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-amide **49*

Deoxycholic acid (500 mg, 1.27 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved under argon in 1,4-dioxane (10.7 mL) at 10°C. Triethylamine (238 μ L, 1.7 mmol, 1.34 equiv.) and ethyl chloroformate (184.5 mg, 1.7 mmol, 1.34 equiv.) in 1,4-dioxane (0.8 mL) were added dropwise and the reaction was stirred at room temperature for 30 min. In parallel, 2-(pyridin-2-yl)ethan-1-amine **47** (316 mg, 1.7 mmol, 1.34 eq) was dissolved in dry DCM (5 mL), triethylamine (476 μ L, 3.4 mmol, 2.68 equiv.) was added dropwise and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. This solution was added dropwise to the *in situ* prepared deoxycholic anhydride, and the reaction was stirred at room temperature for 20 h. The solvent was evaporated under vacuum, then the crude was dissolved in DCM. The organic phase was washed successively twice with water, 0.1 M solution of HCl, water and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude material was purified by silica gel column chromatography with a step gradient of DCM and MeOH (0-10%). The desired compound **49** was obtained as a white solid (307 mg, 0.55 mmol, 43%). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):** δ = 8.60 (d, J = 4.2 Hz, 1 H, H_{pyridyl}), 7.74 (t, J = 7.3 Hz, 1 H, H_{pyridyl}), 7.61 (d, J = 8.1 Hz, 1 H, H_{pyridyl}), 7.28-7.24 (m, 1 H, H_{pyridyl}), 7.21 (s, 1 H, NH), 3.98-3.96 (m, 1 H, CH-OH), 3.74-3.55 (m, 3 H, NH-CH₂ + CH-OH), 2.99 (t, J = 5.6 Hz, 2 H, CH₂-S), 2.56 (s, 2 H, 2 OH), 2.27-2.33 (m, 1 H, HCH-CNO), 2.17-2.10 (m, 1 H, HCH-CNO), 1.86-1.04 (m, 24 H), 0.99 (d, J = 6.6 Hz, 3 H, CH₃), 0.90 (s, 3 H, CH₃), 0.67 (s, 3 H, CH₃) ppm. **¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz):** 173.9, 158.9, 148.6, 138.4, 121.9, 121.7, 73.2, 71.8, 48.3, 47.1, 46.6, 42.1, 39.2, 37.5, 36.5, 36.1, 35.3, 35.2, 34.1, 33.7, 33.4, 31.6, 30.5, 28.6, 27.5, 27.1, 26.2, 23.7, 23.1, 17.5, 12.8 ppm. **HRMS (ESI⁺):** m/z calcd for C₃₁H₄₉N₂O₃S₂ [M+H]⁺: 561.3185, Found 561.3195.

Solid-phase synthesis of RNA oligonucleotides

The solid-phase synthesis of RNA oligonucleotides procedures were described in the experimental section of chapter I.

Synthesis of modified 2'-O-PySSEAC Oligoribonucleotides **42 and **53****

After RNA elongation, the solid support was treated with 2 mL of a 0.4 M solution of 2,2'-dithiodipyridine (1000 equiv. per modification) and a 2.5 M butylamine (0.5 mL) solution in anhydrous THF (1.5 mL). The solution was applied to the synthesis column using two glass syringes filled with 4Å molecular sieves (5 beads each), and pushed back and forth through the synthesis column for 15 min. Then the solution was removed and the solid-support was

washed with anhydrous THF followed by a 1 min flush with argon. Finally, the solid support was treated with a 30% aqueous ammonia solution for 3 h at 25°C. The solution was evaporated in the presence of isopropylamine (13% of total volume) under reduced pressure. The residue was dissolved in 1.5 mL water, transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized.

Analysis, purification and desalting of RNAs 42 and 53

The crude oligonucleotides were analyzed by IEX-HPLC and characterized by MALDI-TOF spectrometry. The crude oligonucleotides were then purified by semi-preparative IEX-HPLC. The pure fraction of each ON were pooled in a 100 mL round-bottomed flask and were concentrated to dryness under reduced pressure. The residues were dissolved in 100 mL TEAAc buffer, pH 7 and they were desalted using a C₁₈ cartridge (Sep-Pak®, Waters) equilibrated with a 100 mM TEAAc buffer solution. The desired compound was eluted with a 12.5 mM TEAAc / CH₃CN (1:1, v/v) solution in a 50 mL round-bottomed flask and was lyophilized. The residue was dissolved in 1.5 mL water (divided in 3 portions 0.8 mL, 0.4 mL and 0.3 mL for flask rinsing), transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized. Purified RNAs were characterized by MALDI-TOF MS and quantified by UV measurement.

Procedures for conjugation of RNAs in solution phase.

Preparation of RNA conjugates 43, 44, 45 and 54. A 10 mM solution of thioglucose, thiogalactose or glutathione was prepared in HEPES buffer (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05 mM EDTA, 7.5 mM HEPES, pH 8). The buffered solution (10 μL by nmol of RNA) was added to the lyophilized RNA 42 or 53 in a 0.5 mL Eppendorf. The mixture was stirred at 37°C for 24 h using a thermoshaker (Thermal Shake lite®). The reaction was stopped by freezing in liquid nitrogen. The RNA conjugates were purified by IEX-HPLC, desalted and characterized by MALDI-TOF MS using the procedures described above.

Preparation of RNA conjugate 46. A 10 mM solution of 7-mercapto-4-methylcoumarin was prepared in 1:1 mixture of HEPES buffer (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05 mM EDTA, 7.5 mM HEPES, pH 8) and DMF. The buffered solution (10 μL by nmol of RNA) was added to the freeze-dried RNA 42 in a 0.5 mL Eppendorf. Then, the mixture was stirred at 37°C for 24 h using a thermoshaker (Thermal Shake lite®). The reaction was stopped by freezing in liquid nitrogen the RNA conjugate was purified by IEX-HPLC, desalted and characterized by MALDI-TOF MS using the procedures described above.

Preparation of RNA conjugate 50. A 10 mM solution of (+) - Biotin *N* - 2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl amide 48 was prepared in 1:1 mixture of HEPES buffer (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05 mM EDTA, 7.5 mM HEPES, pH 8) and DMF. The solution (100 equiv) was diluted with an equal volume of buffer and a solution of TCEP (50 nmol / μL) (80 equiv). The mixture was stirred for 2 h at 37°C using a thermoshaker (Thermal Shake lite®). Then the solution was added to the freeze-dried RNA 42 in a 0.5 mL Eppendorf and stirred at 37°C for 24 h using a thermoshaker (Thermal Shake lite®). The reaction was stopped by freezing in liquid nitrogen

and the RNA conjugate was purified by IEX-HPLC, desalted and characterized by MALDI-TOF MS using the procedures described above.

Preparation of RNA conjugates 51 and 55. A 10 mM solution of Doxorubicine 2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl carbamate 23 was prepared in DMF. The solution (20 equiv) was diluted with an equal volume of HEPES buffer (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05 mM EDTA, 7.5 mM HEPES, pH 8) and a solution of TCEP (50 nmol / μL) (16 equiv). The mixture was stirred for 2 h at 37°C using a thermoshaker (Thermal Shake lite®). Then the solution was added to the freeze-dried RNA 42 or 53 in a 0.5 mL Eppendorf and stirred at 37°C for 5 min using a thermoshaker (Thermal Shake lite®). The reaction was stopped by addition of a large excess of HEPES buffer pH 5. The RNA conjugates were immediately purified by RP-HPLC, characterized by MALDI-TOF MS using the procedures described above.

Preparation of RNA conjugate 52. A 10 mM solution of *N*-(2-(pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl)-3α,12α-dihydroxy-5β-cholan-24-amide 49 was prepared in 2:3 mixture of HEPES buffer (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05 mM EDTA, 7.5 mM HEPES, pH 8) and DMF. The solution (100 equiv) was diluted with an equal volume of buffer and a solution of TCEP (50 nmol / μL) (80 equiv). The mixture was stirred for 2 h at 37°C using a thermoshaker (Thermal Shake lite®). Then, the solution was added to the freeze-dried RNA 42 in a 0.5mL Eppendorf and stirred at 37°C for 24 h using a thermoshaker (Thermal Shake lite®). The reaction was stopped by freezing in liquid nitrogen and the RNA conjugate was purified by RP-HPLC, evaporated and characterized by MALDI-TOF MSy using the procedures described above.

Conjugation yields for RNAs 51 and 55 were calculated from UV absorption at 481 nm of the conjugated RNAs. Other conjugation yields were calculated from UV absorption at 260 nm of conjugated RNAs.

Reductive conversion of RNA under glutathione treatment

1 nmol of each RNA conjugates were freeze dried in 500μL Eppendorfs. Lyophilized RNA were dissolved in 100 μL of a glutathione-HEPES buffer (34 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05 mM EDTA, 7.5 mM HEPES, 10 mM glutathione, pH 8) and incubated at 37°C. For RNAs 43, 45, 46, 50 and 52, aliquots were collected after 5 min, 1.5 h, 6 h and 24 h. For RNA 44, aliquots were collected after 1.5 h, 6 h and 24 h. For RNA 51, aliquots were collected after 30 min, 4 h and 24 h. All aliquots were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until analysis. Samples were diluted with water and analyzed by IEX-HPLC and MALDI-TOF.

HPLC analyses of RNA conjugates

N°		Number of biomolecules	Gradient (% of B buffer) ^a	Retention time (min)
<u>42</u>	Pyridyl	1	0 to 60 % in 20 min	11,9
<u>43</u>	Glucose	1	0 to 60 % in 20 min	11,6
<u>44</u>	Galactose	1	0 to 60 % in 20 min	11,3
<u>45</u>	Glutathione	1	0 to 60 % in 20 min	11,6
<u>46</u>	Coumarin	1	0 to 60 % in 20 min	11,8
<u>48</u>	Biotin	1	0 to 60 % in 20 min	12,0
<u>51</u>	Doxorubicin	1	0 to 60 % in 20 min	15,9
<u>52</u>	Deoxycholic acid	1	0 to 60 % in 20 min	12,8
<u>53</u>	Pyridyl	2	0 to 60 % in 20 min	12,8
<u>54</u>	Galactose	2	0 to 60 % in 20 min	11,5
<u>55</u>	Doxorubicin	2	0 to 80 % in 20 min	12,7

^aIEX-HPLC analysis : Dionex DNAPac Pa100, 4x250 mm, buffer A : 20% CH₃CN in 25 mM Tris HCl pH 8, Buffer B : 20% CH₃CN containing 200 mM NaClO₄ in 25 mM Tris HCl pH 8, flow rate : 1 mL / min, detection at 260 nm, Temperature of analysis : 30 °C

Chapitre IV : Synthèse d'ARNs contraints par un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents

Introduction

Lors de la synthèse des prodrogues de siARNs présentée dans le chapitre I, la formation d'un pont disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents modifiés par les groupements AcSM a été mise en évidence en marge de la réaction désirée. Dans ce chapitre, nous avons donc adapté cette réaction pour synthétiser des ARNs contraints par des ponts disulfures intrabrin. L'impact de ces ponts S-S a été étudié sur différents types de structures secondaires d'ARNs, et en particulier dans des hairpins ARNs.

Nous introduirons ce chapitre en présentant les hairpins et leur intérêt biologique. Nous aborderons ensuite différentes méthodes de modifications chimiques d'oligonucléotides par des liens covalents, en particulier utilisant des ponts disulfures, pour introduire des contraintes facilitant les études structurales.

La formation du pont disulfure liant deux nucléotides adjacents sera décrite, ainsi que son impact sur la stabilité thermique de duplex ARN / ARN et ARN / ADN. Différentes hairpins modèles modifiées seront ensuite utilisées pour évaluer l'influence du positionnement d'un lien diméthylène disulfure introduit dans la boucle.

Ces résultats seront appliqués à la modification d'une hairpin ARN d'intérêt biologique, dont les propriétés biophysiques et la stabilité enzymatique seront étudiées pour évaluer l'influence du lien sur la transition entre les formes hairpin et duplex de cet ARN. Enfin, une application en tant que balise moléculaire ou « molecular beacon » sera décrite dans le cadre de la détection d'agents réducteurs par fluorescence.

1. Présentation des hairpins ARN

1.1. Structure des hairpins

Les épingles à cheveux ou « hairpins » sont les structures secondaires les plus fréquentes dans les acides nucléiques.²³⁸ Elles consistent en une structure tige-boucle, composée d'une partie tige dans laquelle les nucléotides sont appariés et d'une partie boucle composée de nucléotides libres (**Schéma 69**).

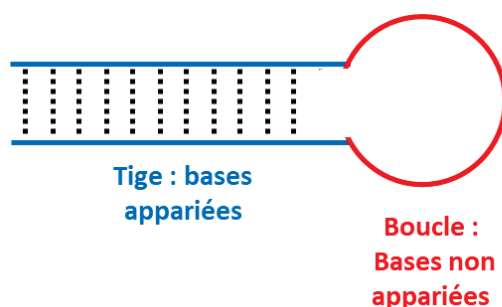


Schéma 69 : Représentation schématique d'une structure hairpin ADN ou ARN

Il existe également des hairpins entièrement auto-complémentaires, formant une structure double brin dans laquelle deux nucléosides terminaux sont liés.²³⁹ De plus, les hairpins peuvent évoluer vers des structures doubles brins, dans lesquelles les parties tiges de deux oligonucléotides s'apparient.²⁴⁰ Ces structures seront étudiées dans la suite de ce chapitre.

1.2. Rôle des hairpins ARNs

Les hairpins interviennent notamment dans les ARNs de transferts (ARNt), dans lesquels trois hairpins sont présentes, participant ainsi à la reconnaissance des ARN messagers (ARNm) et à leur traduction en protéines.

Les hairpins jouent également un rôle dans la structure tridimensionnelle des ARNs et leur reconnaissance par des protéines, par exemple par le biais d'aptamères.²⁴¹ Ces derniers sont des ARNs fortement structurés, générés pour leur capacité à cibler spécifiquement des ligands avec une affinité élevée, tels que des petites molécules organiques, des peptides ou d'autres acides nucléiques (**Schéma 70**).²⁴²

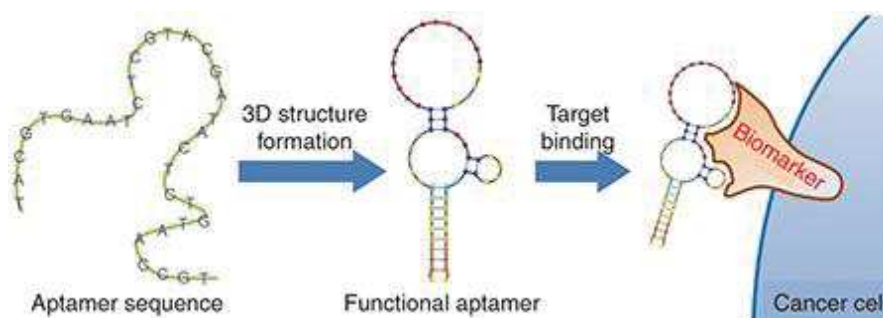


Schéma 70 : Formation et utilisation des aptamères
(Image issue de *Mol Ther Nucleic Acids* 2014, 3, e182²⁴³)

Ces structures leur permettent d'être impliquées dans des processus de riboswitches, contrôlant ainsi l'expression des gènes.²⁴⁴ Elles sont présentes à l'extrémité 5' des ARNm et déclenchent, après activation par interactions avec des protéines ou des petites molécules, des modifications conformationnelles entraînant la traduction de l'ARNm en protéine.²⁴⁵

1.3. Applications biologiques

Leur structure rend intéressante les hairpins synthétiques pour un grand nombre d'applications. Comme décrit dans le chapitre I, leur capacité à produire des ARNs interférents est intéressante pour inhiber l'expression de gènes.²⁴⁶ Après transfection de cellules par un plasmide, les hairpins sont générées dans la cellule par transcription, puis les ARNs interférents sont produits suite à des coupures par l'enzyme Dicer (**Schéma 71**).

Chapitre IV : Synthèse d'ARNs contraints par un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents

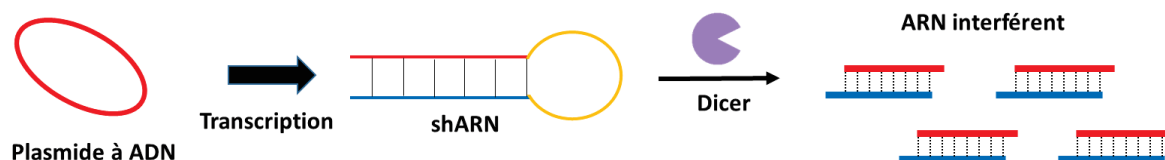


Schéma 71 : Production d'ARNs interférents à partir d'hairpins ARNs (shARN)

Leur utilisation sous forme d'aptamères est également étudiée dans le domaine thérapeutique, par exemple pour cibler des antigènes de surface de cellules cancéreuses.²⁴⁷ Bien que très peu de composés aient réussi à franchir les différentes étapes de tests cliniques jusqu'à maintenant, leur développement pour le diagnostic et le traitement des cancers est un enjeu majeur pour les laboratoires dans les années à venir, pour produire des traitements plus efficaces et plus ciblés.²⁴⁸ D'autres maladies peuvent être ciblées par des aptamères en forme d'hairpin. Par exemple, un oligonucléotide antisens a été couplé à un aptamère dans le cadre du traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Cette maladie est causée par une néovascularisation oculaire au niveau de la partie centrale de la rétine, la macula, engendrant une inflammation et une forte diminution de la vision. Le Pegaptanib (**Figure 66**), un aptamère de 28 nucléotides commercialisé depuis 2004 par OPI Pharmaceuticals, s'associe aux récepteurs extracellulaires du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.²⁴⁹ Cette affinité bloque l'angiogenèse et limite donc la maladie. L'efficacité du composé a été renforcée en augmentant sa stabilité enzymatique grâce à la conjugaison de deux chaînes polyéthylènes glycol.^{247b, 250}

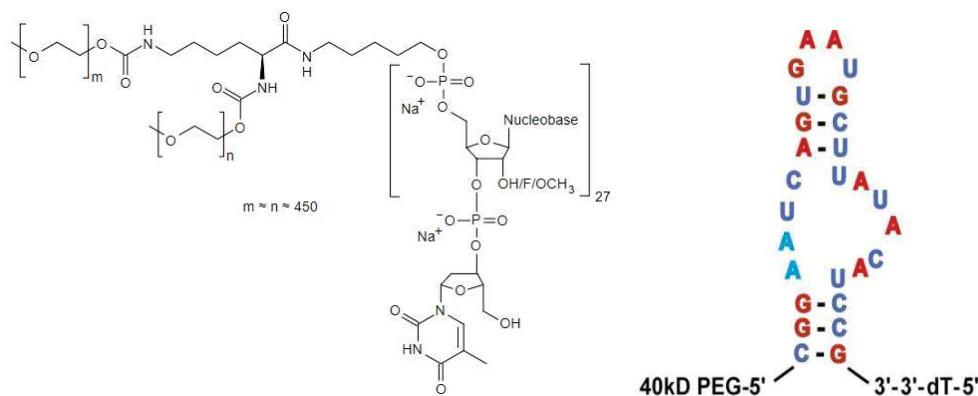


Figure 66 : Structure du Pegaptanib (Figure de droite issue de *Ophthalmology* 55(6):427-30 · March 2007²⁵¹)

L'exemple du Pegaptanib illustre les espoirs placés dans cette nouvelle classe de composés. Comme le montre la **Figure 66**, des nucléotides modifiés 2'-F et 2'-OMe ont été utilisés pour garantir la stabilité de l'ARN. Le développement d'hairpins modifiées chimiquement est donc nécessaire pour exploiter leur plein potentiel.

2. Intérêt des oligonucléotides contraints pour des études structurales

2.1. Introduction de contraintes structurales dans les hairpins

Une cible privilégiée pour cette approche est l'extrémité de la partie tige. Une cyclisation est notamment possible entre une fonction 5'-phosphate et l'extrémité 3'-OH de l'oligonucléotide. Ces réactions sont régulièrement effectuées enzymatiquement, *via* une ligase, et présentent l'avantage de conserver le squelette phosphodiester classique. La cyclisation peut aussi être réalisée par voie chimique pour introduire un lien covalent entre les deux extrémités, empêchant la dissociation de la partie double brin pour faciliter la réalisation d'études structurales (**Figure 67**). Une forte amélioration de la stabilité thermique a été mise en évidence, avec une augmentation des T_m de plus de 20 °C.²⁵²

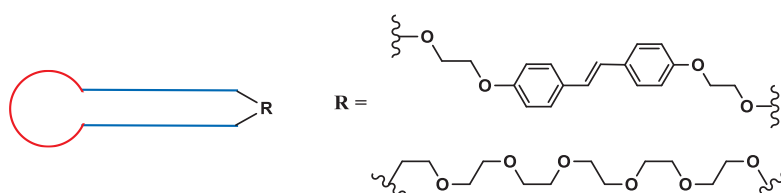


Figure 67 : Exemple d'une hairpin contrainte par un lien placé aux extrémités de la partie tige

Une caractéristique de ces acides nucléiques partiellement auto-complémentaires est leur capacité à être en équilibre entre deux formes : une forme repliée en hairpin ou une forme étendue avec une partie appariée en duplex et une partie non appariée formant un renflement appelé « bulge » (**Schéma 72**).

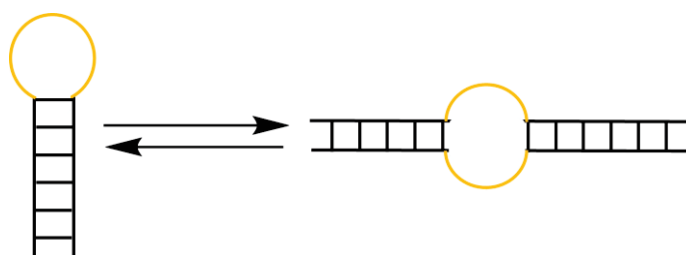


Schéma 72 : Equilibre entre les formes hairpin et duplex d'un ARN auto-complémentaire

La modulation de cet équilibre a été étudiée, notamment *via* l'introduction de modifications au niveau de la boucle. Par exemple, l'équipe de R. Micura a démontré que la présence ou l'absence d'un groupe méthyle sur une base de la boucle favorise l'une ou l'autre de ces conformations.²⁵³ Les méthylations étudiées correspondent à celles rencontrées sur les ARNs cellulaires, telles que la N^2,N^2 -diméthylguanosine, la N^6,N^6 -diméthyladénosine, la 3-méthyluridine ou la N^4 -méthylcytidine. Ces résultats ont ainsi permis une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la structure secondaire des ARNs.

2.2. Introduction de modifications contenant des ponts disulfures

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, les ponts disulfures ont été à de nombreuses reprises exploités pour des études structurales d'oligonucléotides *via* des modifications intra^{27, 254} ou interbrins.^{34, 40a, 255}

2.2.1. Ponts disulfures dans des doubles brins

Différentes modifications contenant des ponts disulfures ont été introduites dans un oligonucléotide, dont la structure et les propriétés ont été étudiées après association à son brin complémentaire. Un exemple de lien intrabrin et deux exemples de liens interbrins en vue d'études structurales vont être présentés.

Tout d'abord, la formation d'un lien contenant un pont disulfure intrabrin entre deux nucléotides s'est révélée utile pour étudier l'hybridation de deux brins.²⁵⁶ Ce pont S-S a été introduit par l'équipe de C. Richert sur la position C⁵ de deux désoxyuridines à partir des synthons thioalkynyldésoxyuridines préalablement incorporés sur un brin d'ADN (**Schéma 73**). La stabilité thermique de duplex ARNs et ADNs a ainsi été modulée, avec des ΔT_m compris entre -5 °C et + 14 °C selon le positionnement et la longueur des liens. De plus, l'augmentation de la rigidité de la structure a amélioré l'affinité et la sélectivité de sondes ciblant des courts oligonucléotides.

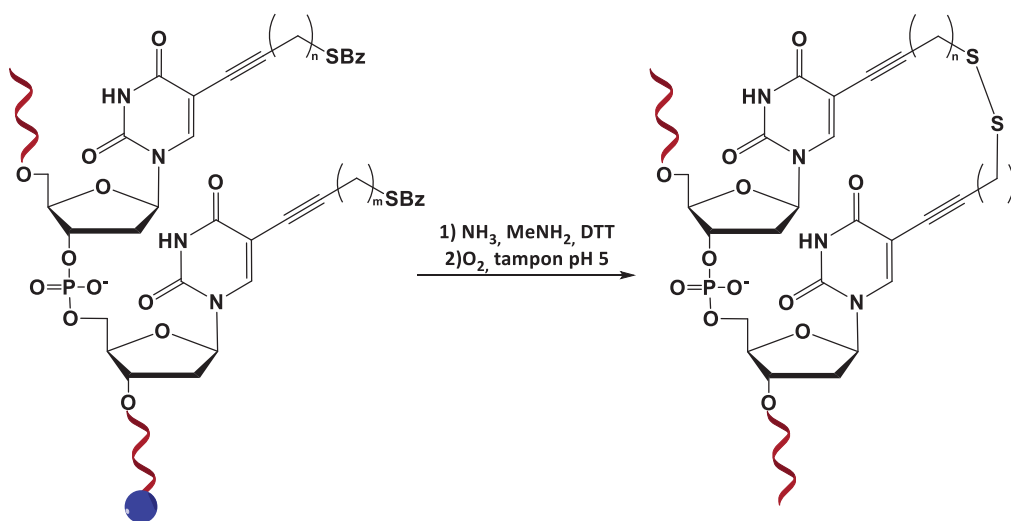


Schéma 73 : Structure des liens à pont disulfure entre les bases de deux désoxyuridines adjacentes dans un ADN²⁵⁶

Des liaisons interbrins en position 2' ont également été étudiées. En particulier, la stabilité enzymatique d'un duplex ARN auto-complémentaire a été fortement augmentée ($\Delta T_m > 40$ °C) par la liaison de deux thiols portés par des liens N-éthylurées introduits sur des uridines en position 2'.²⁵⁵ La flexibilité de la double hélice d'ADN a par ailleurs été étudiée grâce à des liens mercaptopropyles ou mercaptobutyles introduits en position 2' d'une adénosine.²⁵⁷ Ces fonctions SH ont été positionnées sur chaque brin du duplex, pour interagir

Chapitre IV : Synthèse d'ARNs contraints par un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents

uniquement en cas de déformations de la structure les rapprochant tridimensionnellement (**Schéma 74**). Ainsi, les altérations de l'ADN dues aux rayonnements UV, créant des structures tricycliques déformées, ont été identifiées par la formation de ponts disulfures.

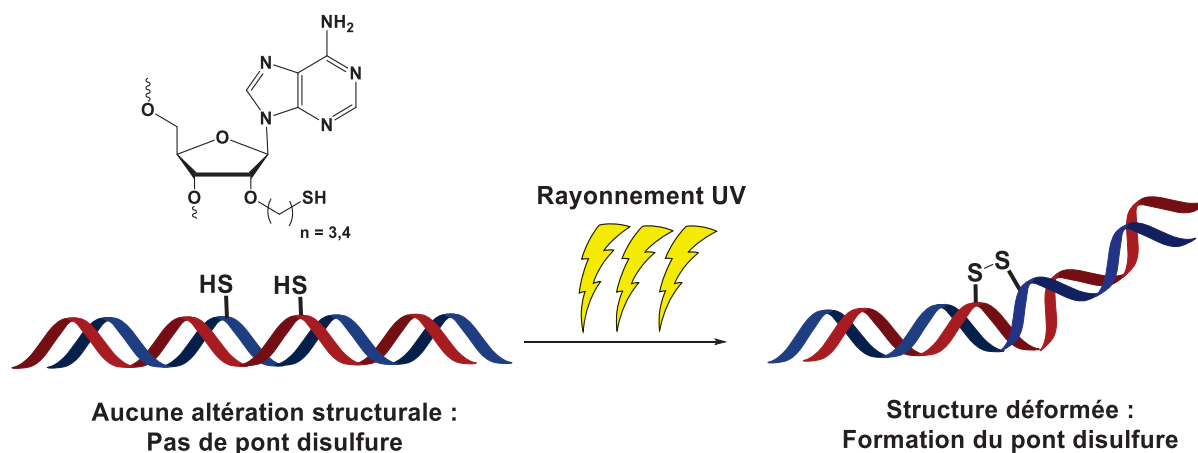


Schéma 74 : Formation d'un pont disulfure dépendante d'une déformation structurale entre deux adénosines modifiées en position 2'

2.2.2. Ponts disulfures introduits dans des hairpins

Plusieurs approches ont été envisagées pour modifier des hairpins ADNs ou ARNs en utilisant des ponts disulfures.^{40b}

Tout d'abord, la ligation sur des hairpins ADNs servant de guide a été étudiée.^{28b, 258} Deux oligonucléotides ont été utilisés, respectivement modifiés aux extrémités 5' et 3' par des phosphorothioates, dont l'un est activé sous forme disulfanylpyridine. Après appariement des deux brins, la proximité des deux thiols permet le couplage des deux oligonucléotides (**Schéma 75**). Ce pont disulfure est ensuite disponible pour d'autres réactions de couplage, par exemple avec des protéines.²⁵⁸⁻²⁵⁹

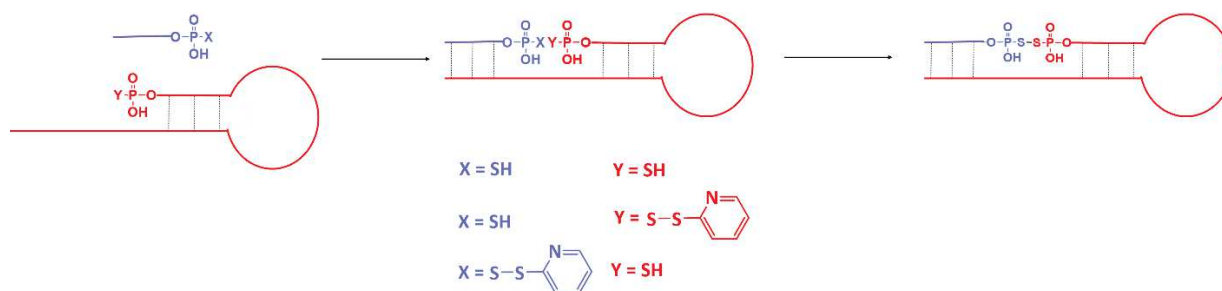


Schéma 75 : Conjugaison entre deux phosphorothioates dans une hairpin ADN

Néanmoins, la majorité des travaux décrits dans la littérature concernent l'étude structurale des hairpins. Une première stratégie consiste à bloquer la structure sous sa forme hairpin grâce à un pont disulfure introduit sur les bases entre les extrémités 5' et 3' (**Figure 68**).²⁶⁰ La contrainte empêche la dénaturation de la partie tige pour former une structure double brin par le mécanisme de transition hairpin – duplex mentionné précédemment. La

structure d'hairpins ainsi « fermées » par un pont disulfure aux extrémités 5' et 3' a été déterminée par RMN 2D COSY $^1\text{H} / ^1\text{H}$ et NOESY $^1\text{H} / ^1\text{H}$, grâce à l'apport de stabilité engendrée par le lien covalent.^{260d, 261}

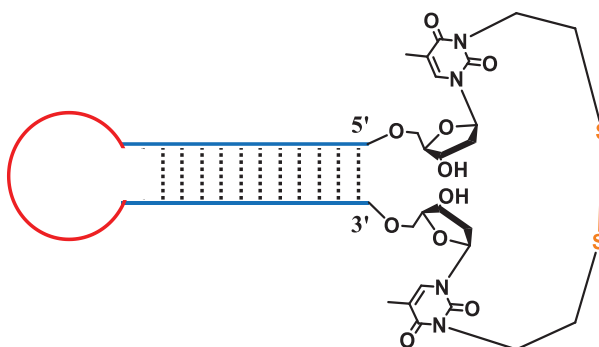


Figure 68 : Hairpin ADN sous forme contrainte par un pont disulfure entre les extrémités 5' et 3'

Des structures secondaires de tailles plus importantes ont aussi été étudiées. L'équipe de D. Glick a travaillé sur des ARNt, dont la structure secondaire est très contrainte (**Figure 69**). Le pont disulfure a été formé grâce à des groupements thioéthyles introduit sur les azotes N^3 ou les positions 2' de deux uridines éloignées dans la séquence mais proches tridimensionnellement. Cette modification a facilité l'analyse structurale de l'ARNt par diffraction aux rayons X, le blocage de la conformation facilitant la cristallisation²⁶², et ont démontré une faible influence sur l'organisation tridimensionnelle, malgré l'apport de stabilité engendré.^{262b, 263}

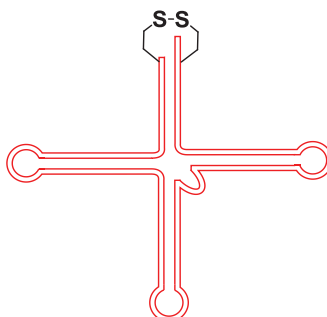


Figure 69 : ARNt modifié par un pont disulfure

Enfin, la modification d'un ribozyme en tête de marteau (« hammerhead ribozyme ») a également été explorée. Il s'agit d'ARNs ubiquitaires fortement structurés, agissant comme des enzymes, en catalysant la coupure ou la ligation spécifique d'un ARN substrat par transestérification entre l'hydroxyle 2'-OH terminal du ribozyme et une liaison phosphodiester de l'ARN cible.²⁶⁴ Cette réaction induit la formation d'une part d'un ARN 5'-OH et d'autre part d'un ARN portant un cycle 2',3'-phosphodiester. Des nucléotides 2'-amino ont été introduits dans le ribozyme et l'ARN substrat par la chimie des phosphoramidites, et ont ensuite été convertis en liens 3-(pyridin-2-yl)disulfanylpropanamides. Après réduction du groupe disulfanylpyridine placé sur le ribozyme en thiol, le lien covalent a été formé par une réaction d'échange thiol-disulfure avec le groupe S-S-Pyridine du substrat (**Figure 70**). Ce dernier a

rigidifié la structure du complexe enzyme-substrat et permis l'étude de son fonctionnement et la modulation des activités ligases et nucléases. En effet, la limitation de la flexibilité a favorisé fortement la cinétique de ligation sans impacter celle de coupure.²⁶⁵ La même méthodologie a ensuite été appliquée à l'étude d'autres ribozymes.²⁶⁶

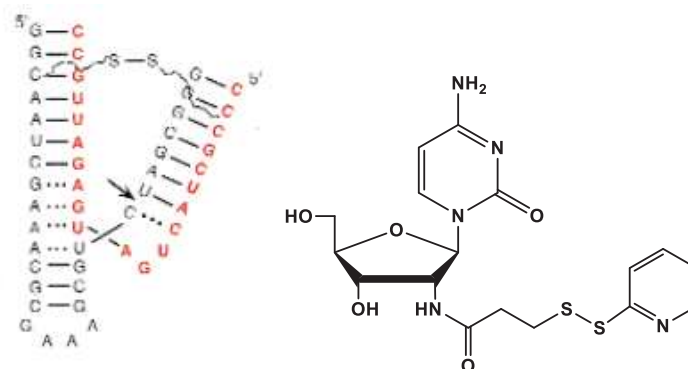


Figure 70 : Structure du complexe ribozyme (en rouge) - ARN substrat (en noir) contraint par un pont disulfure et du nucléotide 2'-O-3-(pyridin-2-yl)disulfanylpropanamide (figure issue de *Nat Struct Biol.* 2001 Oct;8(10):863-7^{264b})

3. Incorporation du lien diméthylène disulfure dans un duplex

3.1. Synthèse d'un ARN contenant un lien diméthylène disulfure entre deux uridines adjacentes

Au cours de travaux précédents du laboratoire (thèse d'Annabelle Biscans), une réaction secondaire avait été identifiée et caractérisée lors de la réaction d'échange thiol-disulfure sur support solide pour synthétiser des ARNs modifiés par des groupes contenant des ponts S-S sur les positions 2' de deux nucléosides 2'-O-AcSM adjacents.⁸⁷ Nous avons exploré cette réaction pour la synthèse d'ARNs modifiés par un pont disulfure intrabrin.

Dans un premier temps, nous avons synthétisé l'ARN **56**, formé de 14 nucléotides avec, au centre de la séquence, deux uridines adjacentes portant des groupements 2'-O-AcSM (**Tableau 21**).

N°		m/z calculée	m/z obtenue ^a	ARN d'intérêt ^b (%)	Quantités isolées ^c (nmol)
56	GCC UUC UUA UGA UU	4434,8	4430,9	42	19

Tableau 21 : Caractérisation de l'ARN **56**

Lien diméthylène disulfure représenté en rouge

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ([M-H])

^bPourcentage du pic de l'ARN d'intérêt en aire relative du chromatogramme IEX- HPLC du brut de déprotection à 260 nm

^cQuantités isolées après purification mesurées par spectrophotométrie à 260 nm à partir d'une synthèse à l'échelle de 1 μ mol

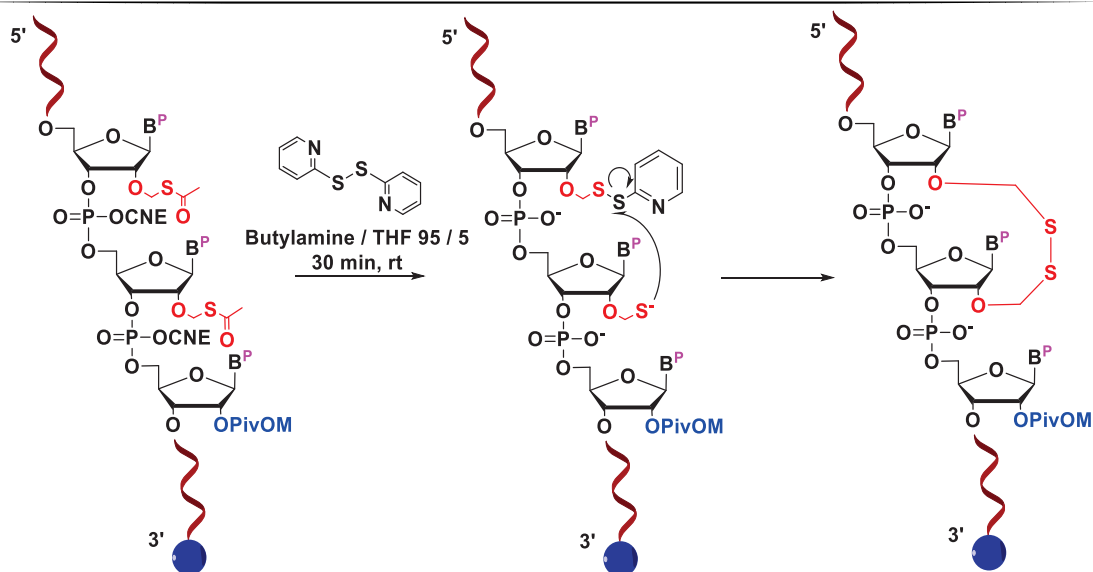


Schéma 76 : Synthèse des ARNs modifiés par un lien diméthylène disulfure

La formation du lien diméthylène disulfure a ensuite été réalisée en 30 minutes sur support, dans un mélange THF / Butylamine (95:5, v/v), en présence de 20 équivalents de 2,2'-dithiodipyridine (Schéma 76). En présence de butylamine, les fonctions thioesters sont enlevées pour donner deux thiolates, dont l'un effectue alors une réaction d'échange thiol-disulfure sur la 2,2'-dithiodipyridine pour générer un groupement disulfanylpyridine. Une réaction intramoléculaire d'échange thiol-disulfure s'effectue ensuite entre le thiolate de l'uridine adjacente et le dérivé disulfanylpyridine formé, créant le lien diméthylène disulfure. Enfin, la coupure de l'ARN du support solide et la déprotection des nucléobases et des positions 2'-OH ont été réalisées avec une solution d'ammoniaque pendant 3 h pour obtenir l'ARN **56**. L'ARN brut a été purifié et analysé par IEX-HPLC puis caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 71).

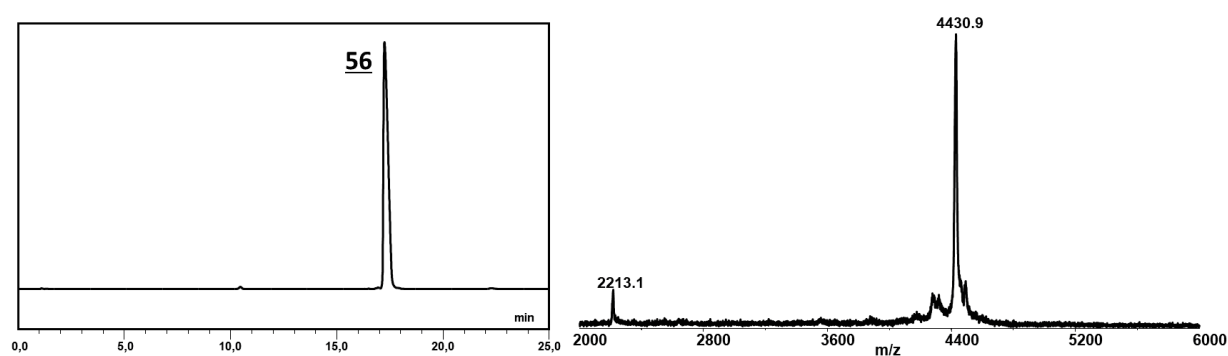


Figure 71 : Chromatogramme HPLC et spectres de masse MALDI-TOF de l'ARN **56** pur

3.2. Etude de la stabilité thermique de duplex ARN / ARN et ADN / ARN formés avec l'ARN modifié 56

L'ARN 56 a été hybridé à son ARN complémentaire pour former le duplex D2 et à son ADN complémentaire pour former le duplex D4. Leur stabilité a été évaluée par des expériences de dénaturation thermique, suivies par spectrophotométrie UV à 260 nm, en prenant pour référence les duplex non modifiés D1 (ARN / ARN) et D3 (ARN / ADN) (**Tableau 22**).



N°	Duplex		T_m (°C) ^a	ΔT_m (°C) ^b
<u>D1</u>	5' GCC UUC UUA UGA UU 3' 3' CG GAA GAA UAC UAA 5'	ARN / ARN	56,4	-
<u>D2</u>	GCC UUC  UGA UU 3' CG GAA GAA UAC UAA 5'	ARN / ARN	44,8	-11,6
<u>D3</u>	5' GCC UUC UUA UGA UU 3' 3' d(CG GAA GAA UAC UAA) 5'	ARN / ADN	37,2	-
<u>D4</u>	GCC UUC  UGA UU 3' d(CG GAA GAA UAC UAA) 5'	ARN / ADN	23,7	-13,5

Tableau 22 : Valeurs de T_m des duplex ARN / ARN et ARN / ADN D1 à D4

Lien diméthylène disulfure représenté en rouge

^aValeurs de T_m obtenues par spectrophotométrie UV à 260 nm. $C_{ARN} = 1,5 \mu M$, tampon = cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM pH 7. La valeur obtenue correspond à la moyenne de 2 cycles dénaturation / hybridation (gradient entre 0 °C et 90 °C). Erreur estimée : $T_m = \pm 0,5$ °C

^b ΔT_m = Différence entre la valeur de T_m du duplex et la valeur de T_m du duplex non modifié

Une forte déstabilisation est constatée, respectivement de -11,6 °C pour le duplex ARN / ARN D2 par rapport au duplex non modifié D1 et -13,5 °C pour le duplex ARN / ADN D4 par rapport au duplex non modifié D3. Cette déstabilisation induite par le pont diméthylène disulfure intrabrin est du même ordre que celle induite par un mésappariement ou « mismatch » dans un duplex.

Le lien diméthylène disulfure étant défavorable à la stabilité de structures duplex, nous avons voulu étudier son influence dans la partie boucle d'hairpins ARNs.

4. Incorporation du lien diméthylène disulfure dans une boucle homouridine d'hairpins ARNs modèles

Cette étude a tout d'abord été effectuée sur deux séquences modèles d'ARNs partiellement auto-complémentaires, contenant des boucles formées de 4 (H4) ou 5 (H5) uridines non appariées (**Figure 72**).

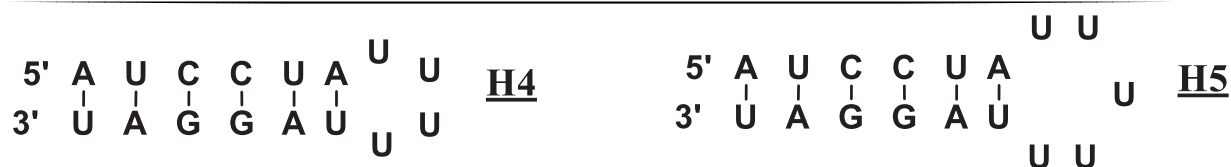


Figure 72 : Séquences des modèles d'hairpins ARNs **H4** et **H5**

Nous avons repris des séquences qui avaient été utilisées dans une étude précédente sur l'impact de dinucléotides contraints sur la stabilité d'hairpins ADNs.²⁶⁷

4.1. Synthèse des hairpins ARNs modèles

Toutes les hairpins modèles modifiées ont été obtenues par la même stratégie de synthèse que l'ARN **56**. D'une part, l'hairpin **H4** a été modifiée par un lien diméthylène disulfure en trois positions différentes : à l'extrémité 5' de la boucle (**H4-1**), au milieu de la boucle (**H4-2**) ou à l'extrémité 3' de la boucle (**H4-3**). D'autre part, le lien a été placé dans l'hairpin **H5** en quatre positions différentes : à l'extrémité 5' de la boucle (**H5-1**), au milieu de la boucle (**H5-2**), à l'extrémité 3' de la boucle (**H5-3**) ou aux deux extrémités (**H5-4**) (**Tableau 23**).

Les ARNs **H4-1**, **H4-2** et **H4-3** présentent des proportions respectives de 54%, 54% et 39% sur les chromatogrammes IEX-HPLC des bruts de déprotection. Les ARNs **H5-1**, **H5-2**, **H5-3** sont présents dans des proportions similaires (42%, 42% et 41%) (**Figure 73**). L'impact d'un seul lien diméthylène disulfure dans la boucle à 4 ou 5 uridines apparaît donc relativement uniforme quelle que soit sa position. L'ARN **H5-4** a été obtenu avec une proportion plus faible de 28%, en raison de la présence de deux liens diméthylènes disulfures dans la boucle augmentant les possibilités de produits secondaires.

Les ARNs ont ensuite été purifiés et analysés par IEX-HPLC et caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (**Tableau 23**). En raison de l'abondance de structures secondaires dues à la forme hairpin, ce qui complexifie le chromatogramme, la purification a été effectuée à 75°C pour dénaturer ces structures et obtenir une meilleure séparation. Les hairpins **H4** et **H5** modifiées ont été purifiées et obtenues en quantités satisfaisantes (**Figure 74**).

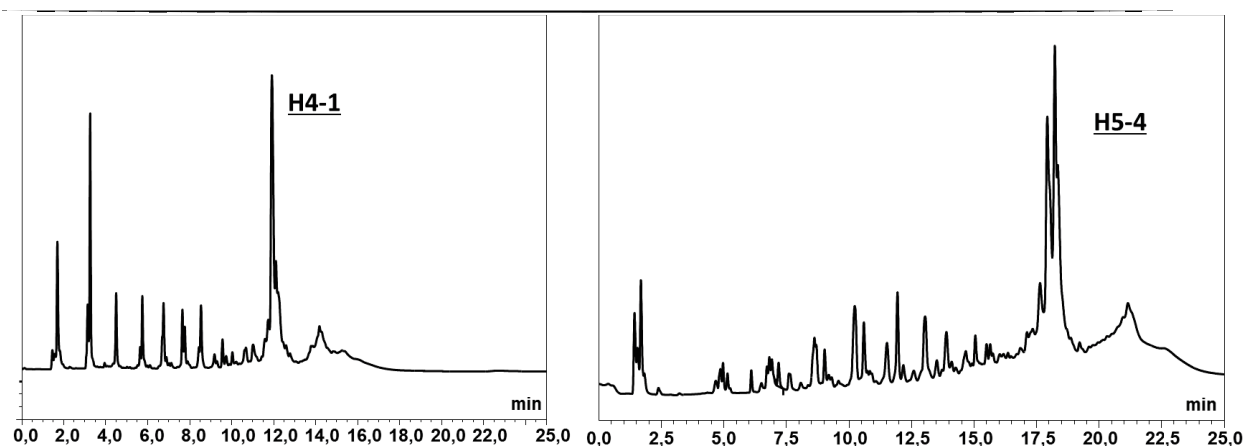


Figure 73 : Exemples de chromatogrammes IEX-HPLC bruts des ARNs H4-1 et H5-4

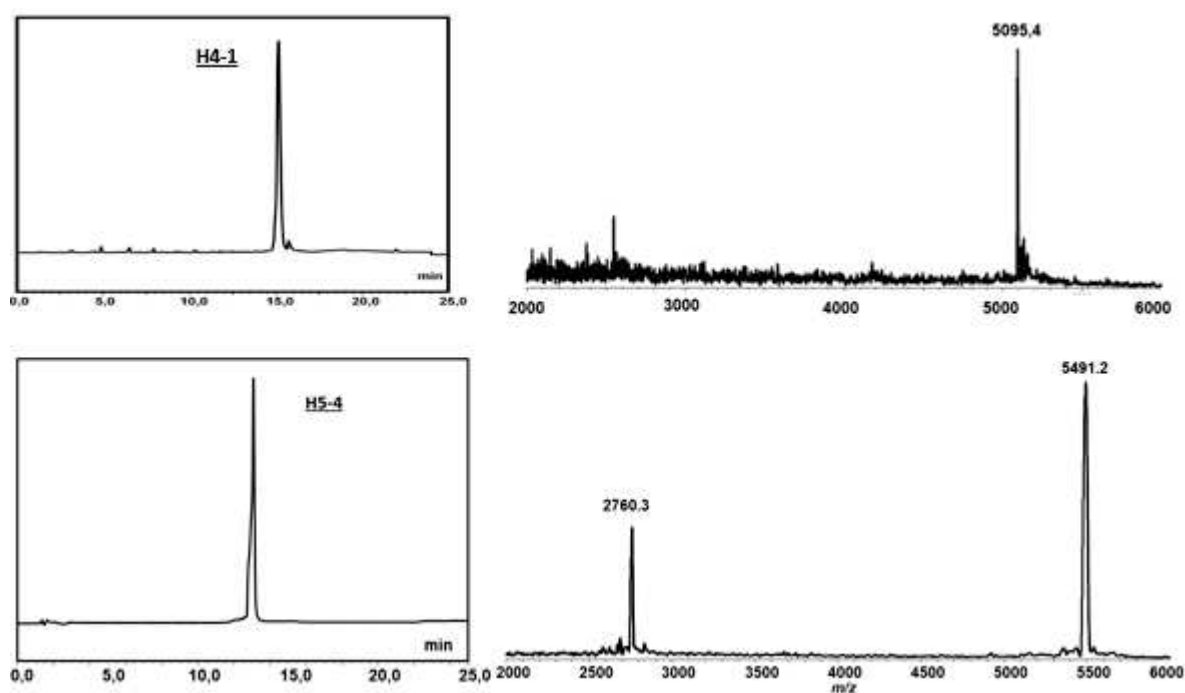


Figure 74 : Chromatogrammes IEX-HPLC et spectres de masse MALDI-TOF des hairpins H4-1 et H5-4 purs

4.2. Etudes structurales des hairpins modifiées

Différentes études biophysiques ont été menées pour évaluer la contrainte induite par le lien diméthylène disulfure au niveau de la boucle des hairpins modifiées.

4.2.1. *Stabilité thermique des hairpins modèles modifiées*

Dans un premier temps, les oligonucléotides non modifiés H4 et H5 et le duplex de 14-mers D1 étudié précédemment ont été analysés par gel d'électrophorèse, pour confirmer leur structuration.

Chapitre IV : Synthèse d'ARNs contraints par un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents

Les deux ARNs et le duplex, en solution à 5 μM dans le même tampon que pour les expériences de dénaturation thermique, ont été chauffés à 90 °C pour obtenir une dénaturation complète, puis refroidis lentement jusqu'à 4 °C avant l'analyse par électrophorèse (**Figure 75**). Le duplex **D1** formé de 28 nucléotides au total migre moins que les ARNs **H4** et **H5** formés de 16 ou 17 nucléotides. L'électrophorèse séparant les oligonucléotides par taille, ce résultat confirme que **H4** et **H5** non modifiées existent exclusivement sous forme hairpin. Les transitions observées sur les courbes de fusion, à 63,6 °C pour **H4** et 62,4 °C pour **H5**, correspondent donc à la dénaturation de la structure hairpin (**Tableau 24**).

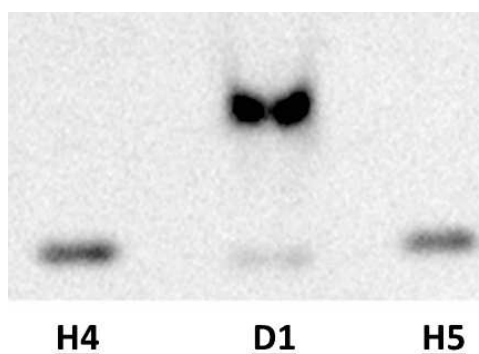


Figure 75 : Electrophorèse (15% polyacrylamide) des hairpins **H4** et **H5** en comparaison avec le duplex 14-mers non modifié **D1**

$C_{\text{ARN}} = 5 \mu\text{M}$, tampon = cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM pH 7. Migration dans du tampon TBE à pH 7 à 4 °C. Révélation avec un transilluminateur UV après 1 h d'incubation avec du GelRed 3X (VWR) dans une solution de NaCl à 0,1 M

Les hairpins modifiées **H4-1** à **H4-3** et **H5-1** à **H5-4** ont ensuite été analysées par gel d'électrophorèse et comparées à **H4** et **H5** non modifiées (**Figure 76**). Les résultats ont été corrélés à ceux obtenus sur les courbes de dénaturation thermique (**Tableau 24**).

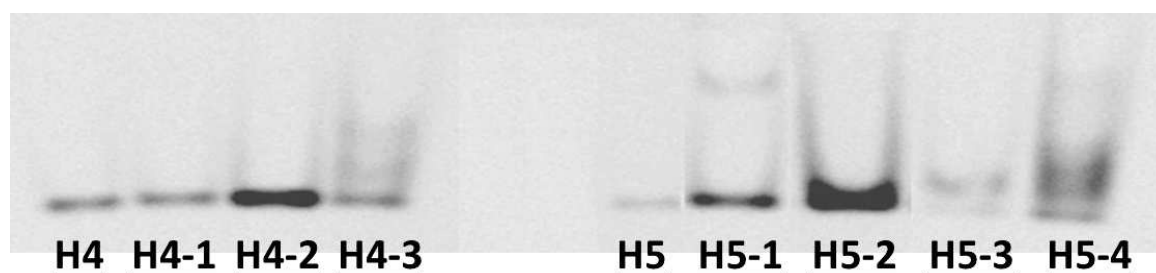


Figure 76 : Electrophorèse (15% polyacrylamide) des hairpins modifiées **H4** à **H4-3** et **H5** à **H5-4**

$C_{\text{ARN}} = 5 \mu\text{M}$, tampon = cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM pH 7. Migration dans du tampon TBE à pH 7 à 4 °C. Révélation avec un transilluminateur UV après 1 h d'incubation avec du GelRed 3X (VWR) dans une solution de NaCl à 0,1 M

Chapitre IV : Synthèse d'ARNs contraints par un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents

N°	T_m (°C) ^a	ΔT_m (°C) ^b
H4	63,6	-
H4-1	64,2	+0,6
H4-2	66,3	+2,7
H4-3	59,7	-3,9
N°	T_m (°C) ^a	ΔT_m (°C) ^b
H5	62,4	-
H5-1	31,2 / 62,5	-
H5-2	62,4	0
H5-3	58,5	-3,9
H5-4	-	-

Tableau 24 : Valeurs de T_m des hairpins **H4** à **H4-3** et **H5** à **H5-4** modifiées par des liens diméthylènes disulfures

^aValeur de T_m obtenue par spectrophotométrie UV à 260 nm. $C_{ARN} = 1,5 \mu M$, tampon = cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM pH 7. La valeur obtenue correspond à la moyenne de 2 cycles dénaturation / hybridation (gradient entre 0 °C et 90 °C). Erreur estimée : $T_m = \pm 0,5$ °C

^b ΔT_m = Différence entre la valeur de T_m du duplex et la valeur de T_m du duplex non modifié

Les courbes des ARNs modifiés **H4-1** à **H4-3** présentent une seule transition, correspondant à la dissociation de la forme hairpin, confirmée par la présence d'une seule bande de même migration que celle de **H4** sur l'électrophorèse (**Figure 76**). Néanmoins, des effets variables apparaissent selon la position du lien. A l'extrémité 3' de la boucle (**H4-3**), le lien engendre une déstabilisation ($\Delta T_m = -3,9$ °C) alors qu'à l'extrémité 5' (**H4-1**), une légère stabilisation est observée ($\Delta T_m = +0,6$ °C). En revanche, une stabilisation plus importante est induite par la présence du lien au milieu de la boucle (**H4-2**) ($\Delta T_m = +2,7$ °C).

Des résultats variables sont obtenus pour les hairpins modifiées **H5-1** à **H5-4**. En particulier avec le lien à l'extrémité 5' de la boucle, **H5-1** présente une double transition sur la courbe (31,2 °C et 62,5 °C) (**Figure 77**). Une espèce non identifiée migrant plus lentement est détectable sur le gel d'électrophorèse et peut correspondre à cette transition (**Figure 76**). De plus, pour l'ARN **H5-4** possédant deux liens diméthylènes disulfures, aucune transition n'a été détectée. La courbe obtenue n'est pas une sigmoïde, indiquant que les contraintes introduites engendrent une perte de coopérativité empêchant la formation de l'hairpin. L'absence d'une espèce stable majoritaire est confirmée par l'électrophorèse, avec l'obtention d'une large bande diffuse montrant l'équilibre entre de nombreuses espèces (**Figure 76**). A l'inverse, pour l'ARN **H5-3**, possédant un seul lien à l'extrémité 3' de la boucle, une transition nette est visible sur la courbe de fusion et une seule bande est visible sur le gel d'électrophorèse. Néanmoins,

une nette déstabilisation est observée ($\Delta T_m = -3,9$ °C). Cette position apparait donc défavorable, bien que moins déstabilisante qu'à l'extrémité 5'. Enfin, l'ARN **H5-2** est peu perturbé par la contrainte du lien puisqu'une seule bande est visible par électrophorèse et la courbe de fusion est superposable à celle de l'hairpin **H5** non modifiée. L'ensemble de ces résultats indiquent que le lien diméthylène disulfure ne perturbe pas la structuration de l'ARN **H5-2** en hairpin quand il est positionné en milieu de boucle, éloigné des régions appariées.

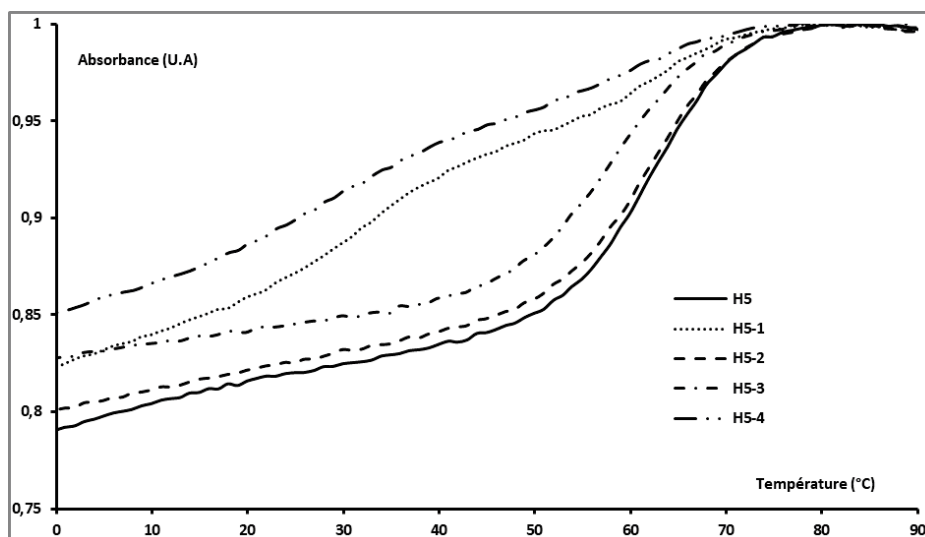


Figure 77 : Courbes de dénaturation thermique des ARNs **H5-1** à **H5-4** en comparaison avec l'ARN non modifié **H5**

4.2.2. *Etude de la conformation des hairpins par dichroïsme circulaire*

Les empreintes spectrales des hairpins **H4** à **H5-4** ont été déterminées par dichroïsme circulaire, en comparant les hairpins **H4-1** à **H4-3** à **H4** et les hairpins **H5-1** à **H5-4** à **H5** (**Figure 78**). La forme A de l'hélice d'ARN est conservée pour toutes les hairpins à la vue des bandes caractéristiques observées.

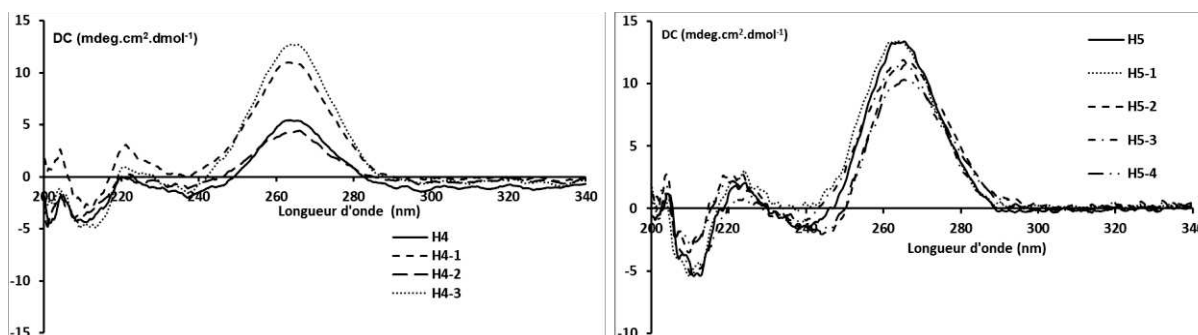


Figure 78 : Empreintes spectrales des hairpins **H4** à **H4-3** et **H5** à **H5-4** modifiées obtenues par dichroïsme circulaire

$C_{ARN} = 1,5$ μ M, tampon = cacodylate de sodium 10 mM, NaCl 100 mM pH 7. Moyennes de 2 mesures.
Température d'analyse : 1 °C

Pour les oligonucléotides **H5-1** à **H5-4**, très peu de variations sont détectables. Seule une légère diminution de l'intensité des bandes est visible. Pour les hairpins à quatre uridines

H4-1 à **H4-3**, les bandes caractéristiques sont conservées mais de grandes variations d'intensité apparaissent au niveau de la bande à 260 nm. En effet, cette dernière est deux fois plus importante pour les ARNs **H4-2** et **H4-3** que pour les ARNs **H4** et **H4-1**. Cette variation est probablement engendrée par une variation de l'empilement des bases en raison de la contrainte induite par le lien.

4.3. Stabilité enzymatique des hairpins modèles **H4** et **H5** modifiées

Les hairpins ont été incubées en présence d'une 3'-exonucléase, la snake venom phosphodiesterase (SVPDE) afin d'évaluer leurs stabilités enzymatiques. Cette enzyme hydrolyse les liens internucléosidiques phosphodiesters à partir de l'extrémité 3' des oligonucléotides, en libérant d'une part un nucléotide 5'-monophosphate 3'-OH et d'autre part un oligonucléotide 3'-OH ayant perdu un nucléoside à l'extrémité 3'.

Les analyses des résultats de digestion ont été effectuées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à différents temps d'incubation. La stabilité enzymatique a été évaluée après incubation des hairpins en présence de 2 mU de SVPDE dans du tampon citrate d'ammonium à 450 mM pendant 24 h à 37 °C. La demi-vie des différents ARNs a été déterminée par la quantification de l'intensité de la bande correspondant à l'ARN non dégradé.

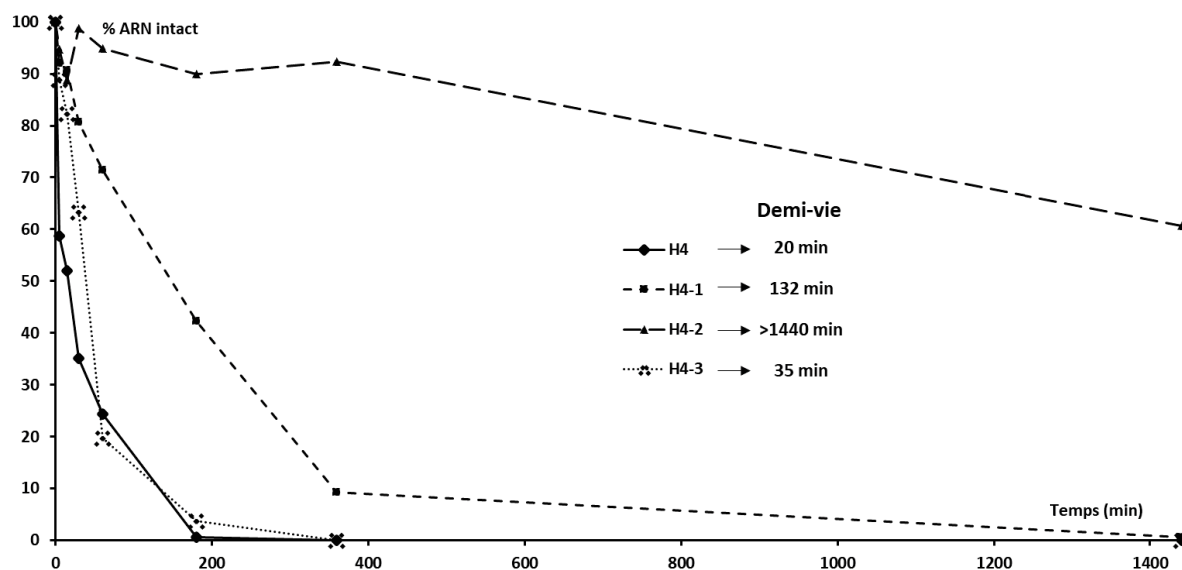


Figure 79 : Dégradation des ARNs **H4** à **H4-3** en présence de SVPDE

Les hairpins **H4** et **H5**, ne possédant pas de modifications, ont été rapidement dégradées et possèdent des demi-vies inférieures à 20 min. Toutes les hairpins modifiées **H4-1** à **H4-3** sont plus stables que l'ARN **H4**, avec une variabilité dépendante de la position du lien dans la boucle (Figure 79). Une demi-vie de 34 min a été obtenue pour la modification à l'extrémité 3' (**H4-3**), soit une faible amélioration, tandis qu'à l'extrémité 5' (**H4-1**), la demi-vie de 132 min démontre une protection plus importante apportée par le lien contenant un

pont S-S. En revanche, la modification en milieu de boucle (**H4-2**) améliore considérablement la stabilité enzymatique, avec plus de 60% d'ARN intact après 24 h alors que toutes les autres hairpins ont été totalement dégradées (**Figure 79**).

Pour les hairpins modifiées à cinq uridines **H5-1** à **H5-4**, une augmentation générale de la stabilité enzymatique est également constatée. Après 1 h, l'ARN **H5** non modifié est dégradé à plus de 98% alors que les hairpins modifiées sont encore présentes en quantités supérieures à 25% (**Figure 80**). Peu de variations sont observées en fonction de la position des modifications. Des demi-vies respectives de 56 min, 33 min et 30 min ont été déterminées pour les hairpins **H5-1**, **H5-2** et **H5-3** possédant un seul pont disulfure. Comme dans le cas de **H4-1**, la modification à l'extrémité 5' de la boucle est plus stabilisante que celle à l'extrémité 3'. L'ARN **H5-4** avec deux ponts disulfures est plus stable, avec une demi-vie de 111 min. La stabilisation engendrée par les liens diméthylènes disulfures est probablement renforcée par les modifications structurales observées précédemment en électrophorèse, perturbant la formation du complexe enzyme-ARN.

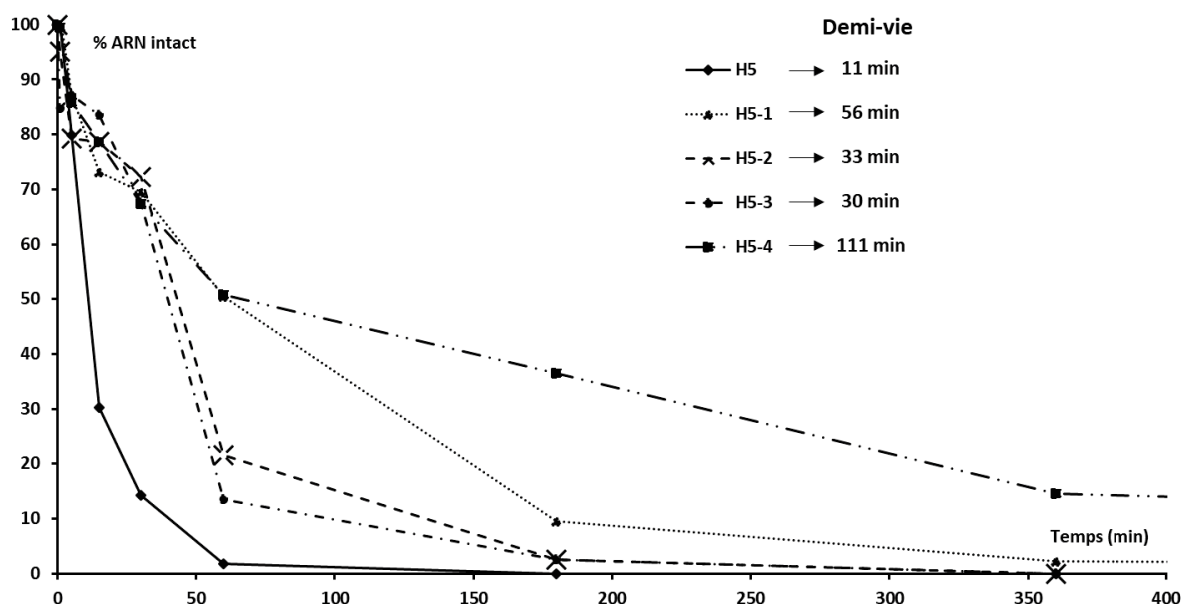


Figure 80 : Dégradation des ARNs **H5** à **H5-4** en présence de SVPDE

A la vue de ces résultats, nous pouvons conclure que la contrainte induite par le lien diméthylène disulfure est peu tolérée dans des duplex ARNs, alors qu'introduite dans une hairpin ARN, au milieu d'une boucle composée de nucléotides non appariés, elle induit une augmentation des stabilités thermique et enzymatique. Ce lien contenant un pont disulfure nous est donc apparu comme un outil efficace pour étudier les équilibres hairpins – duplex sur des structures d'intérêt biologique.

5. Incorporation du lien diméthylène disulfure dans la partie boucle de la séquence HIV-1 DIS

Le « Dimerization Initiation Site (DIS) » du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1), qui adopte une structure en hairpin ou en duplex selon les conditions²⁶⁸, est souvent pris comme modèle pour étudier les propriétés biochimiques et biophysiques de cet ARN après introduction de modifications.²⁶⁹ Ainsi, nous avons cherché à moduler les changements de structure de DIS par l'introduction d'un lien diméthylène disulfure.

La séquence du fragment de 23 nucléotides (**DIS**) choisie (**Schéma 77**) est fortement conservée dans le génome viral²⁷⁰ en raison de son rôle crucial dans la dimérisation de l'ARN et son encapsidation²⁷¹, deux paramètres majeurs pour le virus.²⁷² En effet, la dimérisation est indispensable dans le cycle de réplication, étant impliquée dans la recombinaison, la transcription inverse et la traduction.²⁷³

Ce fragment adopte une structure hairpin formée d'une boucle contenant neuf nucléotides et d'une partie tige formée de sept paires de bases, présente à l'extrémité 5' de l'ARN du virus, et a notamment été utilisée pour des études cristallographiques.²⁷⁴ Sa dimérisation est initiée par l'association de six nucléotides auto-complémentaires présents dans la partie boucle (GUG CAC). L'association de deux boucles par appariement des bases selon Watson-Crick entraîne la formation d'une structure nommée « kissing complex », évoluant spontanément vers une forme double brin plus stable appelée « extended duplex » (**Schéma 77**).

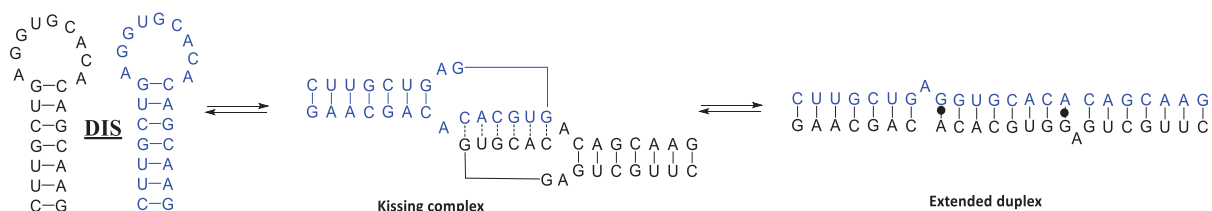


Schéma 77 : Mécanisme de dimérisation de l'ARN **DIS**

5.1. Synthèse des ARNs DIS modifiés

Deux ARNs **DIS-1** et **DIS-2** ont été synthétisés, avec le lien diméthylène disulfure introduit au niveau des nucléotides impliqués dans le « kissing complex » afin de vérifier si ce lien empêche la formation de l'« extended duplex ». La séquence **DIS-1** présente le pont disulfure entre l'uridine et la guanosine tandis que pour la séquence **DIS-2**, il a été introduit entre la cytidine et l'adénosine (**Tableau 25**).

DIS-1 et **DIS-2** ont été obtenus par la même stratégie de synthèse que les hairpins modèles précédentes. Les oligonucléotides bruts ont été analysés par IEX-HPLC à 75 °C et spectrométrie de masse MALDI-TOF (**Figure 81**, **Figure 82**). Les ARNs modifiés sont présents

Chapitre IV : Synthèse d'ARNs contraints par un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents

dans des proportions respectives de 28% (**DIS-1**) et 31% (**DIS-2**) sur les chromatogrammes IEX-HPLC (**Tableau 25**), en raison de la présence importante d'avortons de synthèse.

N°		m/z calculée	m/z obtenue ^a	ARN d'intérêt ^b (%)	Quantités isolées ^c (nmol)
DIS-1		7474,7	7476,9	28	14,0
DIS-2		7474,7	7477,1	31	25,6

Tableau 25 : Caractérisation des ARNs **DIS-1** et **DIS-2**

^aMasse expérimentale obtenue en mode négatif ([M-H])

^bPourcentage du pic de l'ARN d'intérêt en aire relative du chromatogramme IEX- HPLC du brut de déprotection à 260 nm

^cQuantités isolées après purification mesurées par spectrophotométrie à 260 nm à partir d'une synthèse à l'échelle de 1 µmol

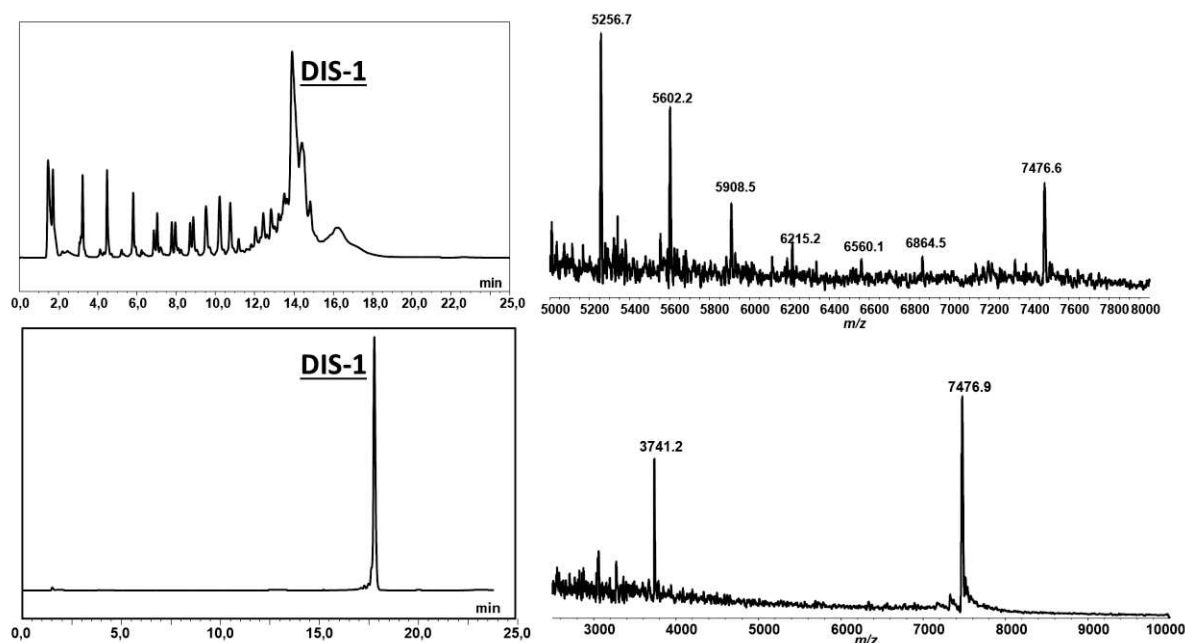


Figure 81 : Chromatogrammes IEX-HPLC et spectres de masse MALDI-TOF de l'ARN **DIS-1** brut (en haut) et pur (en bas)

Les ARNs **DIS-1** et **DIS-2** ont ensuite été purifiés par IEX-HPLC à 75°C, caractérisés par spectroscopie de masse MALDI-TOF (**Figure 81**, **Figure 82**) et obtenus en des quantités relativement faibles, respectivement 14,0 nmol et 25,6 nmol (**Tableau 25**). Ces quantités s'expliquent par les faibles proportions d'ARNs d'intérêt dans les chromatogrammes bruts, les

perdes durant le dessalage et une purification rendue plus difficile par la présence de structures secondaires dénaturées à 75 °C.

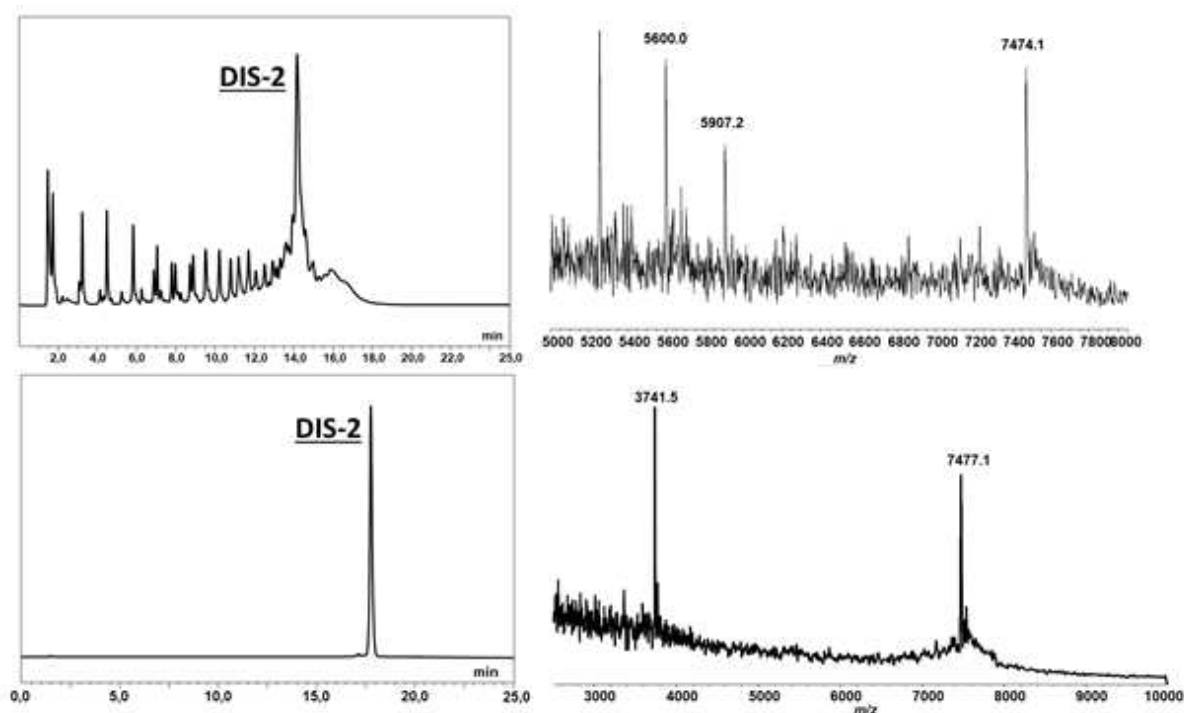


Figure 82 : Chromatogrammes IEX-HPLC et spectres de masse MALDI-TOF de l'ARN DIS-2 brut (en haut) et pur (en bas)

5.2. Etude structurale de la transition hairpin-duplex de l'ARN DIS

5.2.1. *Stabilité thermique des ARNs DIS modifiés*

La détermination des T_m et l'analyse par gel d'électrophorèse ont été effectuées par la même méthode que dans les études précédentes, en utilisant un tampon de composition différente : 20 mM cacodylate de sodium, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 7 (**Figure 83-1**).^{269c, 274}

La courbe de fusion de l'ARN DIS non modifié possède une seule transition avec un T_m de 65,4 °C, indiquant la présence d'une seule structure (**Figure 83-2a**, **Figure 84**). Sur le gel d'électrophorèse, nous observons une bande à la migration plus faible que celle du siARN 1 / 2 servant de référence de duplex, composé de deux brins de 21 nucléotides. Nous pouvons ainsi conclure que la forme « extended duplex » formée de deux brins de 23 nucléotides est prépondérante pour le DIS non modifié.

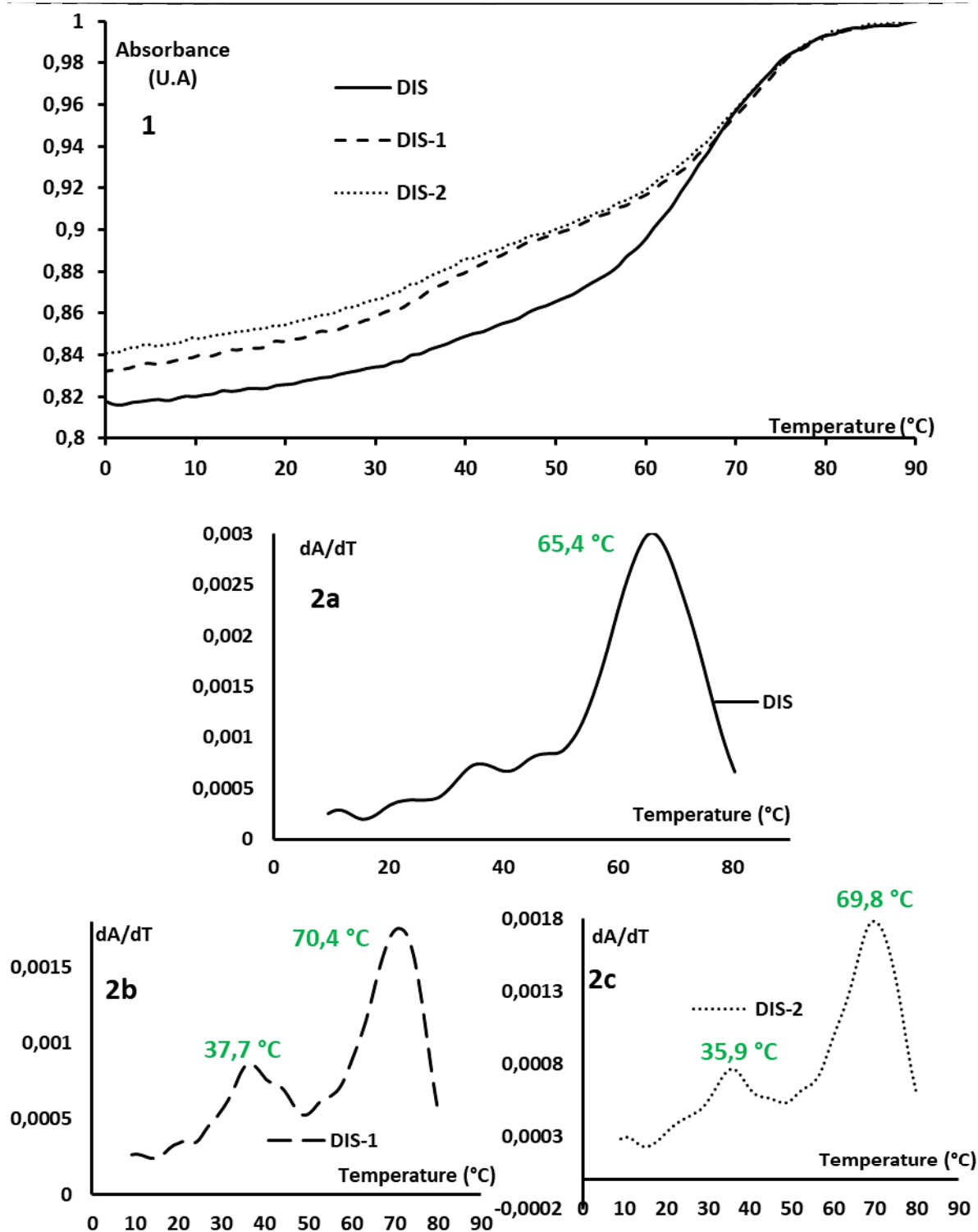


Figure 83 : Courbes de dénaturation thermique (1) et dérivée première des courbes (2a, 2b, 2c) des ARNs DIS, DIS-1 et DIS-2

Valeurs de T_m obtenues par spectrophotométrie UV à 260 nm. $C_{ARN} = 1,5 \mu M$, tampon = 20 mM cacodylate de sodium, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 7. La valeur obtenue correspond à la moyenne de 2 cycles dénaturation / hybridation (gradient entre 0 °C et 90 °C). Erreur estimée : $T_m = \pm 0,5 \text{ °C}$

Chapitre IV : Synthèse d'ARNs contraints par un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents

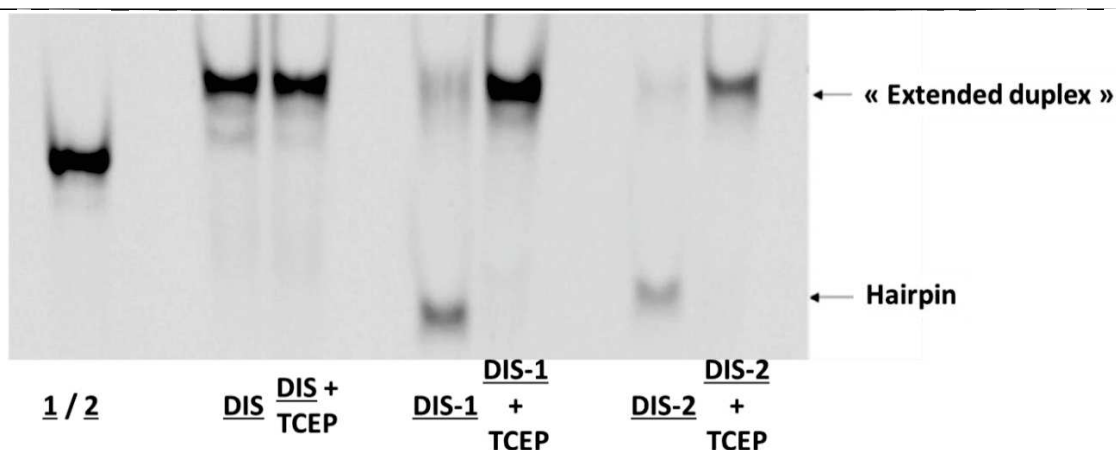


Figure 84 : Gel d'électrophorèse (15% polyacrylamide) des ARNs DIS en présence ou en absence de TCEP

$C_{ARN} = 5 \mu M$, tampon = 20 mM cacodylate de sodium, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7. Migration dans du tampon TBE à pH 7 à 4 °C. Révélation avec un transilluminateur UV après 1 h d'incubation avec du GelRed 3X (VWR) dans une solution de NaCl à 0,1 M

Un comportement différent est observé pour les ARNs modifiés DIS-1 et DIS-2. Tout d'abord, les courbes présentent deux transitions, respectivement à 37,7 °C et à 70,4 °C pour DIS-1 et 35,9 °C et 69,8 °C pour DIS-2 (**Figure 83-2b,c**). Le lien diméthylène disulfure induit donc une variation de structure et un équilibre entre plusieurs espèces. Le gel d'électrophorèse montre une bande intense attribuée aux formes hairpins, identifiées nettement par leur migration beaucoup plus importante que celle des formes duplex (**Figure 84**). Les transitions majeures observées à 70,4 °C pour DIS-1 et 69,8 °C pour DIS-2 correspondent donc aux formes hairpins. A l'inverse, la transition moins marquée pourrait correspondre à l'« extended duplex » très défavorisé par les liens diméthylène disulfures (**Schéma 78**).

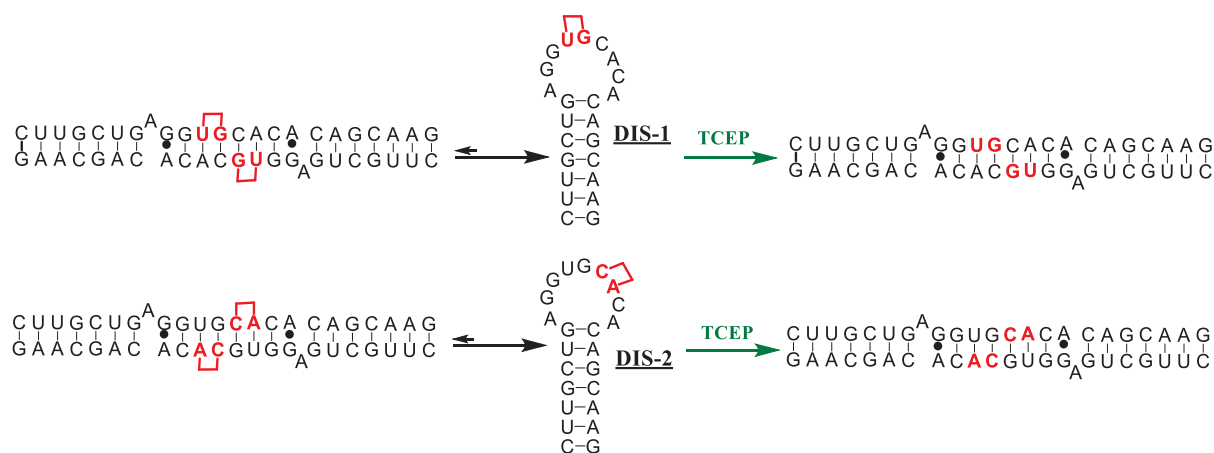


Schéma 78 : Déplacement de l'équilibre entre les formes hairpin et duplex des ARNs DIS-1 et DIS-2 modifiés en présence et en absence de TCEP

Nous pouvons donc conclure que le lien introduit sur les ARNs DIS-1 et DIS-2 a permis d'inverser l'équilibre de la transition hairpin-duplex et de favoriser la forme hairpin.

Pour confirmer ces résultats, une expérience en présence de TCEP a été menée et analysée par gel d'électrophorèse. Dans ces conditions réductrices, la bande correspondant à la forme hairpin a disparu au profit d'une bande de migration beaucoup plus lente correspondant à l'« extended duplex » (**Figure 84**). En milieu réducteur, le pont disulfure est coupé, libérant deux hémithioacétals instables qui, par libération de thioformaldéhyde, permettent de récupérer les ARNs 2'-OH, et d'évoluer vers la formation de l'« extended duplex » (**Schéma 78**). Le pont disulfure est donc très intéressant car il agit comme un verrou bloquant la forme hairpin, pouvant s'ouvrir dans des conditions réductrices pour redonner une structure non modifiée évoluant vers l'« extended duplex ».

5.2.2. *Etude de la conformation par dichroïsme circulaire*

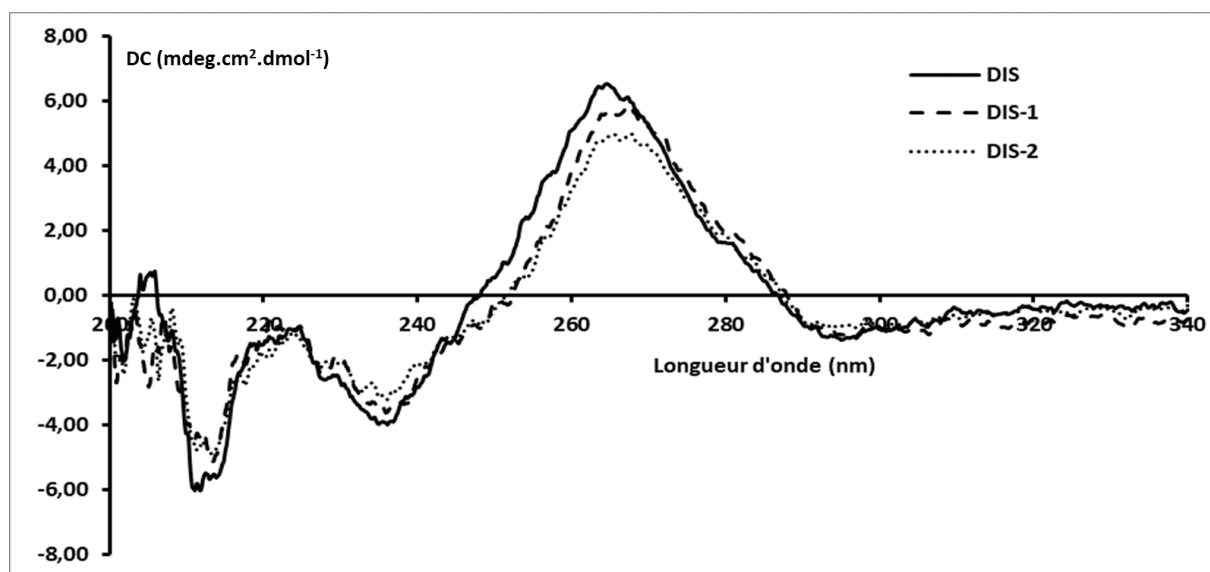


Figure 85 : Empreintes spectrales des **DIS** obtenues par dichroïsme circulaire
 $C_{ARN} = 1,5 \mu M$, tampon = 20 mM cacodylate de sodium, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 7. Moyennes de 2 mesures.
Température d'analyse : 1 °C

L'étude par dichroïsme circulaire des ARNs **DIS**, **DIS-1** et **DIS-2** montre des empreintes spectrales similaires pour les trois ARNs indiquant que la contrainte dans la boucle ne modifie pas leur structure globale en hélice A (**Figure 85**).

5.3. Stabilité enzymatique des DIS modifiés

La stabilité enzymatique a été évaluée en présence de l'enzyme 3'-exonucléase SVPDE et suivie par gel d'électrophorèse après incubation des ARNs en présence de 2 mU de SVPDE pendant 24 h à 37 °C.

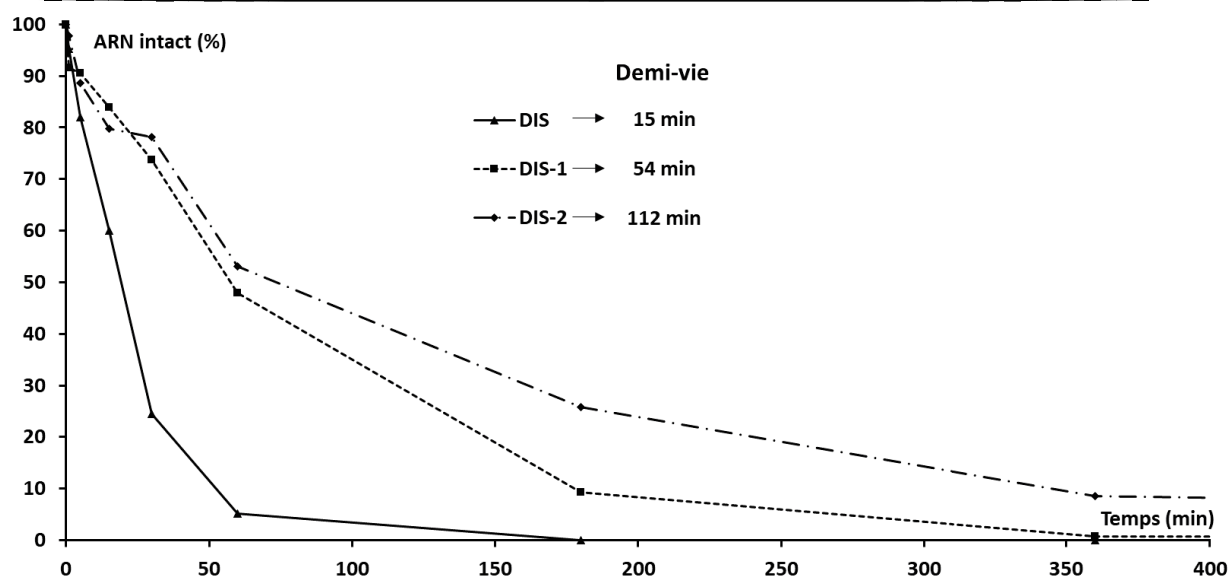


Figure 86 : Dégradation et valeurs de demi-vie des ARNs **DIS** en présence de SVPDE

Après 1 h, le **DIS** non modifié est dégradé à plus de 95% alors que les ARNs modifiés **DIS-1** et **DIS-2** sont encore présents à plus de 45% (Figure 86). Des demi-vies de 54 min pour **DIS-1** et 112 min pour **DIS-2** ont ainsi été déterminées contre 15 min pour le **DIS** non modifié. Ces résultats indiquent une nette augmentation de la stabilité des ARNs **DIS-1** et **DIS-2**. Néanmoins, la différence de stabilité entre **DIS-1** ($t_{1/2} = 54$ min) et **DIS-2** ($t_{1/2} = 112$ min) met en évidence l'influence de la position du lien diméthylène disulfure dans la boucle de l'hairpin sur la résistance aux enzymes.

6. Application en fluorescence des DIS modifiés par le lien diméthylène disulfure comme « molecular beacon »

6.1. Principe

Pour conforter les résultats obtenus par gel d'électrophorèse et par la mesure des T_m , nous avons utilisé l'ARN **DIS** en tant que « molecular beacon » (**DIS-F**). Un fluorophore (la fluorescéine) a été lié en position 5' et un « quencher » en position 3'. Sous la forme hairpin, le « quencher » et le fluorophore sont à proximité l'un de l'autre, bloquant l'émission de fluorescence. L'addition d'un excès d'ARN **DIS** non marqué (Schéma 79 – Voie A) favorise la formation des « extended duplex » formés d'un brin marqué et d'un brin non marqué, émettant de la fluorescence. Avec l'ARN **DIS-2F**, le pont disulfure bloque la structure sous forme hairpin et ne permet pas l'évolution vers la forme « extended duplex » (Schéma 79 – Voie B). En revanche, en milieu réducteur, la coupure du pont disulfure permet de reformer le **DIS-F**, restaurant la formation des « extended duplex » et donc l'émission de fluorescence (Schéma 79 – Voie C).

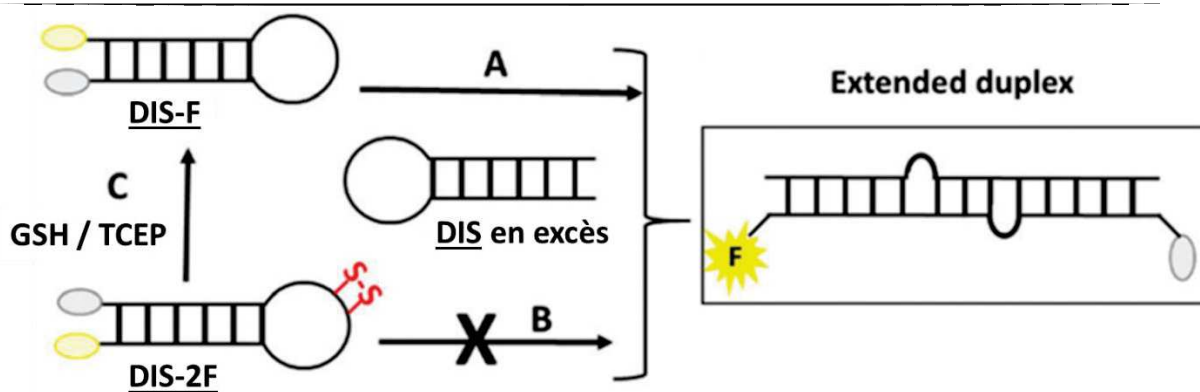


Schéma 79 : Principe du « molecular beacon »

6.2. Synthèse d'un ARN DIS-2F modifié par un lien diméthylène disulfure portant un marqueur fluorescent et un « quencher » aux extrémités 5' et 3'

Le lien diméthylène disulfure entre des nucléotides C et A de la séquence DIS-2 ayant engendré une meilleure stabilité enzymatique de l'ARN, cette séquence a été sélectionnée pour la synthèse d'un ARN DIS-2F marqué à l'extrémité 5' par un fluorophore, la fluorescéine (FAM), et à l'extrémité 3' par un « quencher » (DABCYL). Le même système FAM-DABCYL a été introduit sur l'ARN non modifié DIS-F pour servir de référence (**Tableau 26**).

N°		m/z calculée	m/z obtenue ^a	ARN d'intérêt ^b (%)	Quantités isolées ^c (nmol)
<u>DIS-2F</u>	<pre> C A C A / \ / \ C A G C A A G-DABCYL 3' G U C G U U C-FAM 5' \ / \ / G G A </pre>	8476,4	8476,5	55	21,5
<u>DIS-F</u>	<pre> C A C A / \ / \ C A G C A A G-DABCYL 3' G U C G U U C-FAM 5' \ / \ / G G A </pre>	8383,4	8383,8	71	58,4

Tableau 26 : Caractérisation des ARNs marqués DIS-2F et DIS-F

Un support solide 3'-DABCYL et un phosphoramidite de la fluorescéine commerciale ont été utilisés lors de la synthèse automatisée des ARNs DIS-F et DIS-2F. L'ARN modifié DIS-2F a été obtenu dans des conditions identiques à l'ARN DIS-2. L'oligonucléotide brut a ensuite été analysé par IEX-HPLC (**Figure 87**).

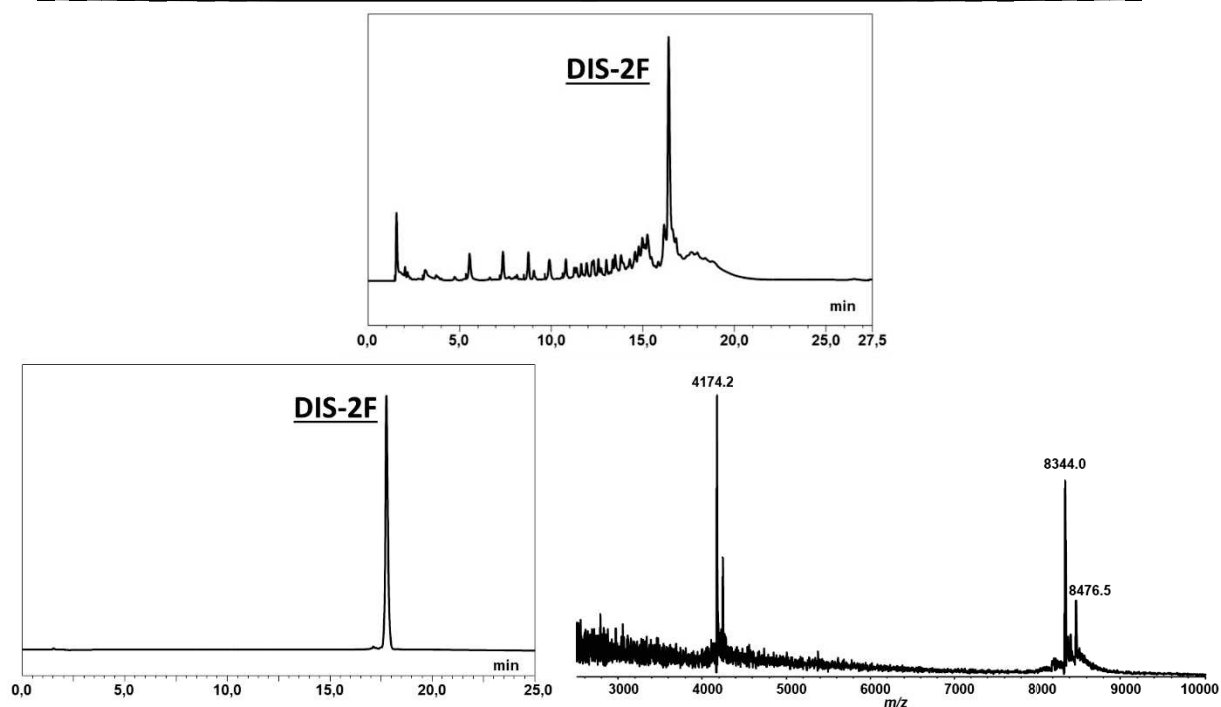


Figure 87 : Chromatogrammes IEX-HPLC de l'ARN **DIS-2F** brut (en haut) et chromatogramme IEX-HPLC et spectre de masse MALDI-TOF de l'ARN **DIS-2F** pur (en bas)

L'analyse IEX-HPLC de l'ARN brut montre que **DIS-2F** est présent dans des proportions de 55%. L'ARN a ensuite été purifié par IEX-HPLC à 75°C et caractérisé par spectroscopie de masse MALDI-TOF (**Figure 87**).

6.3. Validation du modèle en présence de TCEP

Dans une première expérience, le **DIS-F** marqué a été mis en présence de différents ratios de **DIS** non marqué (1:1, 1:2, 1:5 et 1:10) (**Schéma 80A**). Les courbes de fluorescence $\frac{I-I_0}{I_0}$ en fonction de la longueur d'onde montrent que l'intensité de la fluorescence augmente progressivement avec la quantité d'ARN **DIS**, cette augmentation favorisant la formation des « extended duplex » formés d'un brin marqué et d'un brin non marqué.

Chapitre IV : Synthèse d'ARNs contraints par un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents

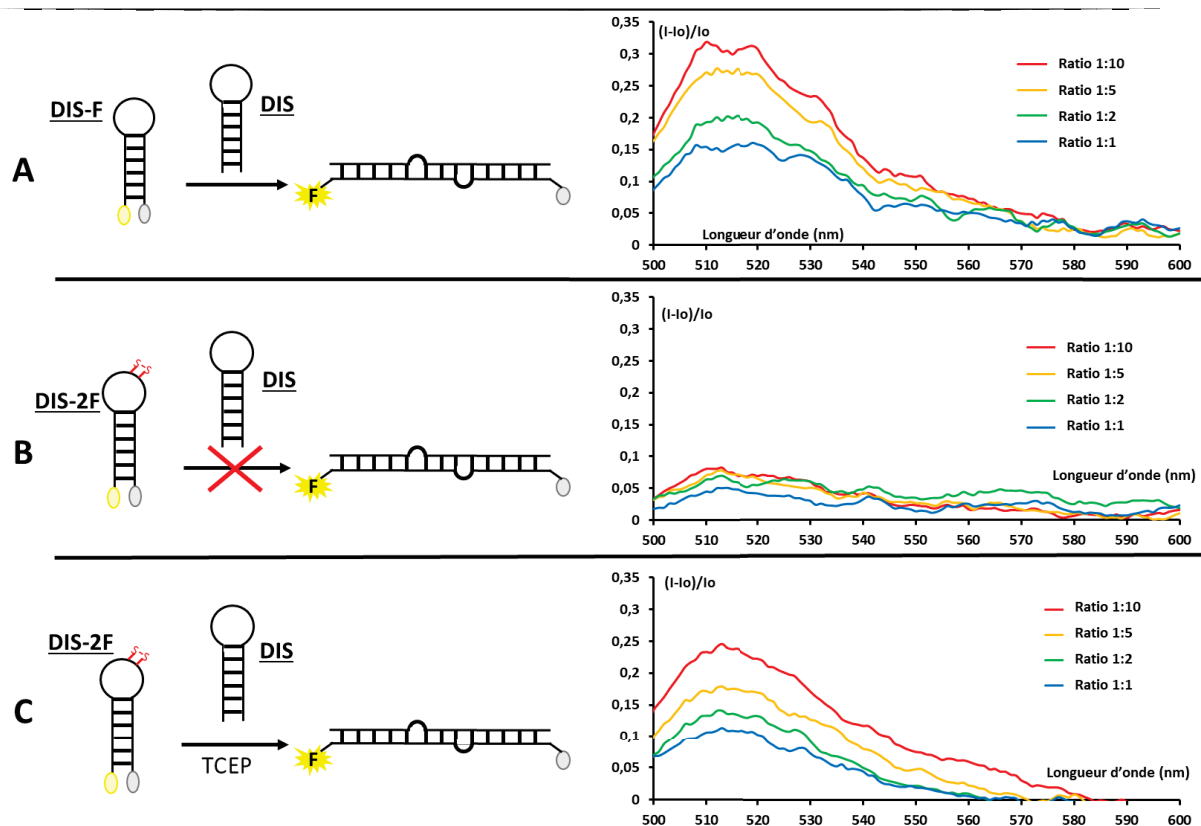


Schéma 80 : Courbes de fluorescence relative $((I-I_0)/I_0)$ de **DIS-F** (A) et **DIS-2F** en absence (B) et en présence de TCEP (C) avec différents ratios de **DIS** (1:1, 1:2, 1:5 et 1:10)

En revanche, cette hausse est limitée, avec une intensité de fluorescence seulement doublée. Cette faible augmentation peut s'expliquer par du quenching, en raison de la proximité des bases ou à la présence de cations, par exemple Mg^{2+} . De plus, deux autres « extended duplex » non fluorescents sont formés dans le milieu (**Figure 88**) :

- Un duplex composé de deux **DIS-F** marqués, dans lesquels une fluorescéine est à proximité d'un quencher à chaque extrémité.
- Un second duplex composé de deux **DIS** non marqués, ne pouvant donc pas émettre de fluorescence.

La formation simultanée de ces trois espèces, dont une seule, formée d'un **DIS-F** et d'un **DIS**, émet de la fluorescence, explique également cette faible intensité du signal.

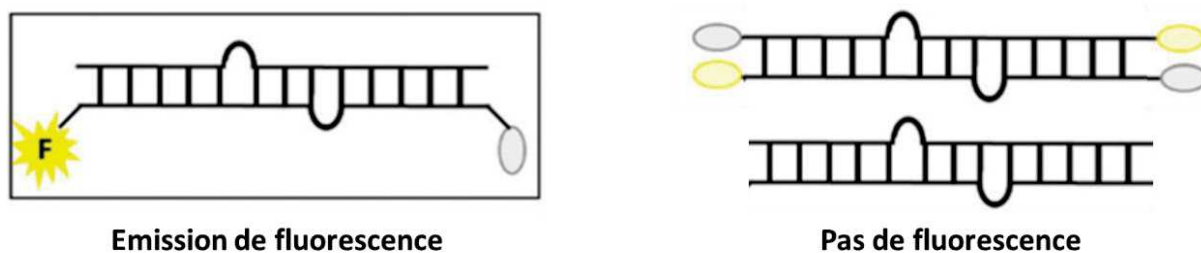


Figure 88 : Espèces potentiellement formées en présence des **DIS**

La même expérience a été effectuée avec l'ARN **DIS-2F** modifié par le lien contenant un pont disulfure. Aucune augmentation de fluorescence n'est constatée quel que soit le ratio utilisé, en raison du blocage de l'ARN dans sa forme hairpin (**Schéma 80B**).

En présence de TCEP, la même augmentation progressive du signal avec la quantité d'ARN **DIS** est observée (**Schéma 80C**). La fluorescence est restaurée, confirmant la récupération de l'ARN non modifié en milieu réducteur. En particulier, en considérant uniquement les valeurs obtenues au maximum de fluorescence ($\lambda = 515$ nm pour la fluorescéine) (**Figure 89**), une augmentation linéaire similaire entre la quantité d'ARN non marqué et l'intensité de fluorescence est obtenue pour l'ARN **DIS-F** et l'ARN **DIS-2F** en présence de TCEP. Ces résultats confirment que le lien à pont disulfure contraint l'ARN dans sa forme hairpin et permet d'envisager ce système comme outil pour la détection d'agents réducteurs.

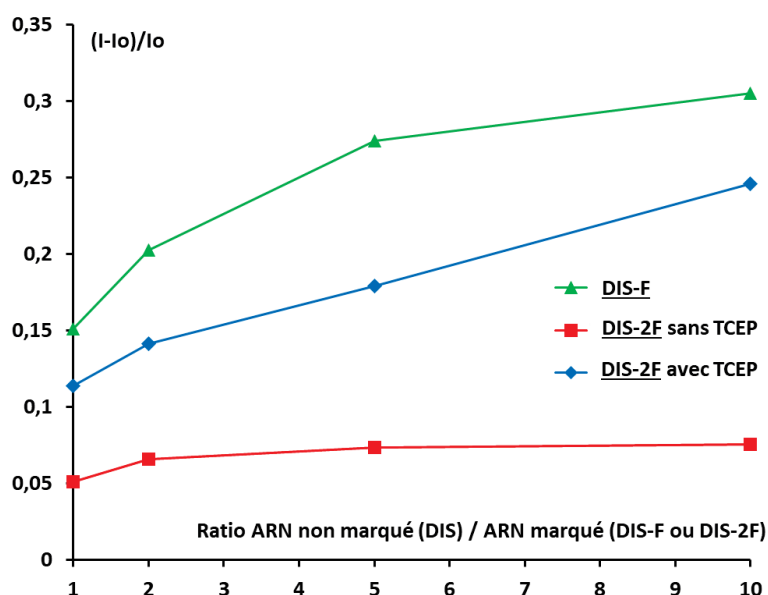


Figure 89 : Evolution de l'intensité du signal fluorescent ($(I-I_0)/I_0$) au maximum de fluorescence ($\lambda = 515$ nm) en fonction du ratio entre les ARNs **DIS** et **DIS-2F** ou **DIS-F**

6.4. Détermination de la limite de détection de glutathion

Le glutathion est régulièrement présent en concentrations supérieures dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines.^{24c} Le suivi de ces variations permettrait de détecter plus efficacement les tumeurs, et ainsi de faciliter leurs traitements.²⁷⁵ Néanmoins, cette détection présente de nombreuses difficultés et seuls deux systèmes de détection par fluorescence utilisant une sonde à ADN ont à notre connaissance été décrits :

- L'équipe de Y. Guo a travaillé sur l'utilisation de simples brins d'ADN partiellement auto-complémentaires s'associant pour former une hairpin, dans laquelle un lien internucléosidique contenu dans la boucle est remplacé par un pont disulfure, permettant ainsi l'obtention d'une structure stable en milieu non réducteur.^{25a, 25e}

- L'équipe de M. Hepel a développé une sonde basée sur une interaction compétitive d'ions mercureux entre du glutathion ou de la cystéine et un ADN auto-complémentaire.²⁷⁶

Pour évaluer la limite de détection en glutathion avec notre « molecular beacon », l'ARN modifié **DIS-2F** a été traité avec des concentrations en glutathion comprises entre 100 nM et 1 mM (100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 60 μ M, 100 μ M, 1mM), en utilisant le ratio 10:1 entre le **DIS** non marqué et le **DIS-2F** marqué. Trois mesures indépendantes ont été réalisées pour chaque concentration. Le spectre d'émission de fluorescence montre une augmentation progressive de l'intensité de fluorescence proportionnelle à la quantité de glutathion (**Figure 90**). Aucune variation n'apparaît entre la référence sans glutathion et la courbe à 100 nM. En revanche, l'augmentation de la fluorescence est constatée nettement à partir de 1 μ M et 10 μ M.

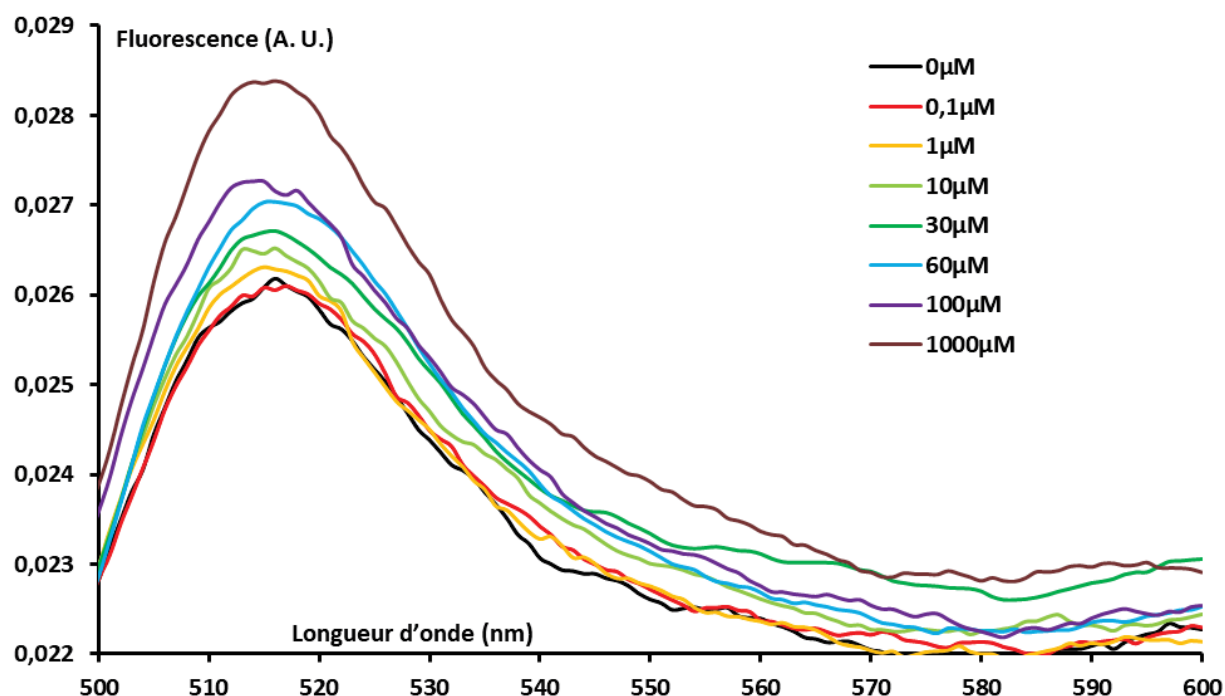


Figure 90 : Spectre d'émission de fluorescence de **DIS-2F** (2 μ M) en présence d'une gamme de concentration en glutathion (100 nM à 1 mM)

*Tampon : 20 mM cacodylate de sodium, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7, concentration d'ARN **DIS** : 20 μ M (ratio 10:1).*

Analyse réalisée à 25°C, entre 400 et 600 nm, longueur d'onde d'excitation de 494 nm.

Mesures moyennes de deux scans et réalisées en triplicat

Pour déterminer plus précisément cette valeur limite de détection, deux méthodes distinctes ont été mises en œuvre.

6.4.1. Méthode 1 : Méthode de la déviation standard

Cette première méthode a été effectuée en suivant la méthodologie présentée dans la publication de M. Hepel mentionnée précédemment.²⁷⁶

L'émission de fluorescence a été mesurée à la longueur d'onde d'émission maximale ($\lambda = 515$ nm) pour les différentes concentrations en glutathion présentées sur la **Figure 90**. Ces valeurs ont été tracées comme fonction de la concentration en glutathion : $\frac{I-I_0}{I_0} = f([GSH])$ (**Figure 91A**).

Cette méthode est basée sur l'algorithme de Levenberg-Marquardt utilisant un ajustement aux moindres carrés, modélisant les données expérimentales par une fonction polynomiale de degré 2 de la forme :

$$\frac{I - I_0}{I_0} = a * [GSH]^2 + b * [GSH] + c$$

L'utilisation de l'algorithme a permis la détermination des différents paramètres de cette équation : $a = -3,75 * 10^{-7} \mu M^{-2}$; $b = 4,55 * 10^{-4} \mu M^{-1}$ et $c = 7,04 * 10^{-3}$. Un bon coefficient de corrélation ($R = 0,991$) et un écart-type faible ($\sigma = 3,69 * 10^{-3}$) ont été obtenus.

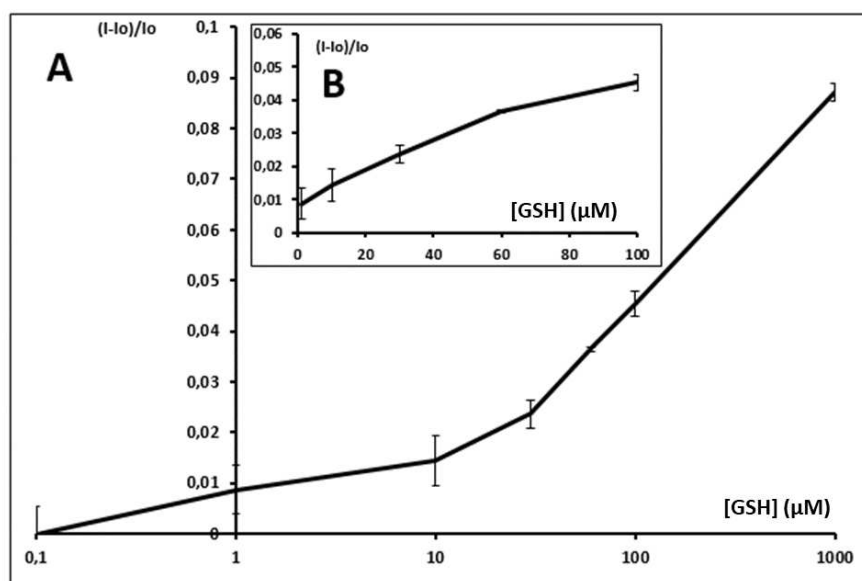


Figure 91 : Evolution de l'émission de fluorescence $((I-I_0)/I_0)$ de **DIS-2F** ($2 \mu M$) à la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence ($\lambda = 515$ nm) en présence d'une gamme de concentrations en glutathion (100 nM à 1 mM)

- A : Gamme complète de concentrations en GSH (représentée en échelle logarithmique) ;
- B : Domaine de linéarité de $1 \mu M$ à $100 \mu M$

La limite de détection est ensuite calculée par la formule $LoD_{GSH} = \frac{3 * \sigma}{s_0}$, dans laquelle s_0 correspond à la pente à l'origine de la courbe polynomiale.²⁷⁷ Celle-ci se calcule à partir de la pente s , correspondant à la dérivée première de la courbe modélisée.

$$s = \frac{d\left(\frac{I - I_0}{I_0}\right)}{d[GSH]} = b + 2a * [GSH]$$

La pente à l'origine correspondant à une concentration nulle en glutathion, la valeur de s_0 est donc égale au paramètre b soit $4,55 * 10^{-4} \mu M^{-1}$. Après calcul, cette méthode évalue la limite de détection en glutathion à **24 μM** .

Le calcul peut par ailleurs être effectué plus simplement en utilisant la méthode des moindres carrés sur un domaine linéaire du type : $\frac{I - I_0}{I_0} = a * [GSH] + b$. Dans notre étude, ce domaine linéaire est défini entre 1 μM et 100 μM (**Figure 91B**). Dans ce cas, l'algorithme détermine les paramètres $a = 3,85 * 10^{-4} \mu M^{-1}$ et $b = 1,07 * 10^{-2}$. Comme pour la méthode polynomiale, un bon coefficient de corrélation ($R = 0,985$) et un écart-type faible ($\sigma = 2,59 * 10^{-3}$) ont été obtenus.

La même formule $LoD_{GSH} = \frac{3 * \sigma}{s_0}$ a alors été réutilisée pour déterminer la limite de détection, avec s_0 représentant la pente de la droite modélisée :

$$s_0 = \frac{d\left(\frac{I - I_0}{I_0}\right)}{d[GSH]} = a = 3,85 * 10^{-4} \mu M^{-1}$$

Dans ce cas, une limite de détection de **20 μM** a été déterminée, très proche de la valeur précédente, indiquant la cohérence des deux méthodes de calcul employées.

6.4.2. Méthode 2 : Méthode des blancs

La seconde méthode consiste à l'utilisation de la méthode des blancs selon la procédure décrite par D. Armbruster *et al.*²⁷⁸ Elle se base sur l'hypothèse d'une distribution gaussienne représentant 95% des mesures observées. Elle s'effectue en trois étapes.

Tout d'abord, la limite de blanc (LoB) est déterminée, correspondant à la plus haute valeur détectable lors de l'analyse successive d'un grand nombre de blancs. Cette valeur permet d'évaluer le bruit inhérent à l'appareil durant la mesure. Après la mesure de 20 échantillons blancs distincts, contenant uniquement l'ARN **DIS-2F** et une concentration nulle en glutathion (**Figure 92**), la LoB a été calculée au maximum d'émission ($\lambda = 515 \text{ nm}$). La moyenne ($Moyenne_{LoB} = 2,61 * 10^{-2}$) et l'écart-type ($\sigma_{blancs} = 2,53 * 10^{-4}$) des intensités ont ensuite été calculés. La limite de blancs a ainsi été déterminée selon la formule :

$$LoB = Moyenne_{LoB} + 1,645 * \sigma_{blancs} = 2,66 * 10^{-2}$$

Chapitre IV : Synthèse d'ARNs contraints par un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents

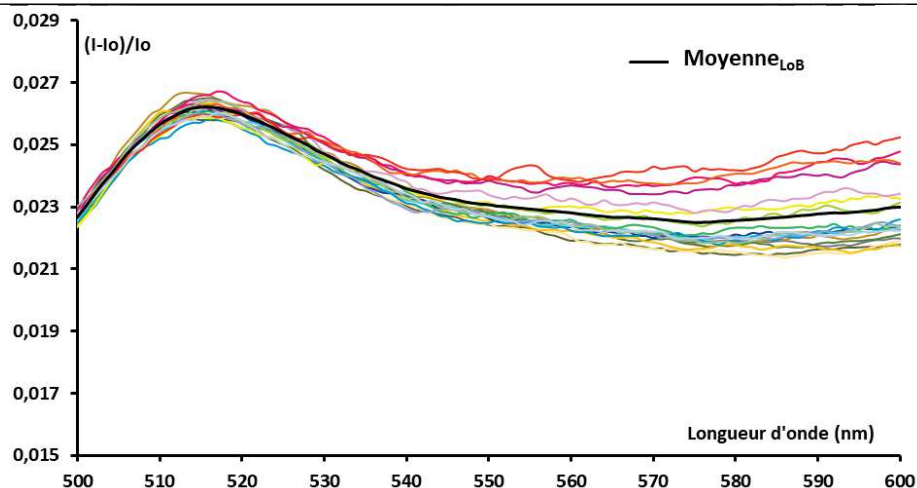


Figure 92 : Courbes de fluorescence et moyenne des 20 blancs utilisés pour la détermination de la LoB

La LoD est calculée à partir de la LoB et de mesures successives sur des échantillons de même concentration. Une concentration de 100 μM en glutathion en **DIS-2F** a été choisie pour ces mesures (Figure 93).

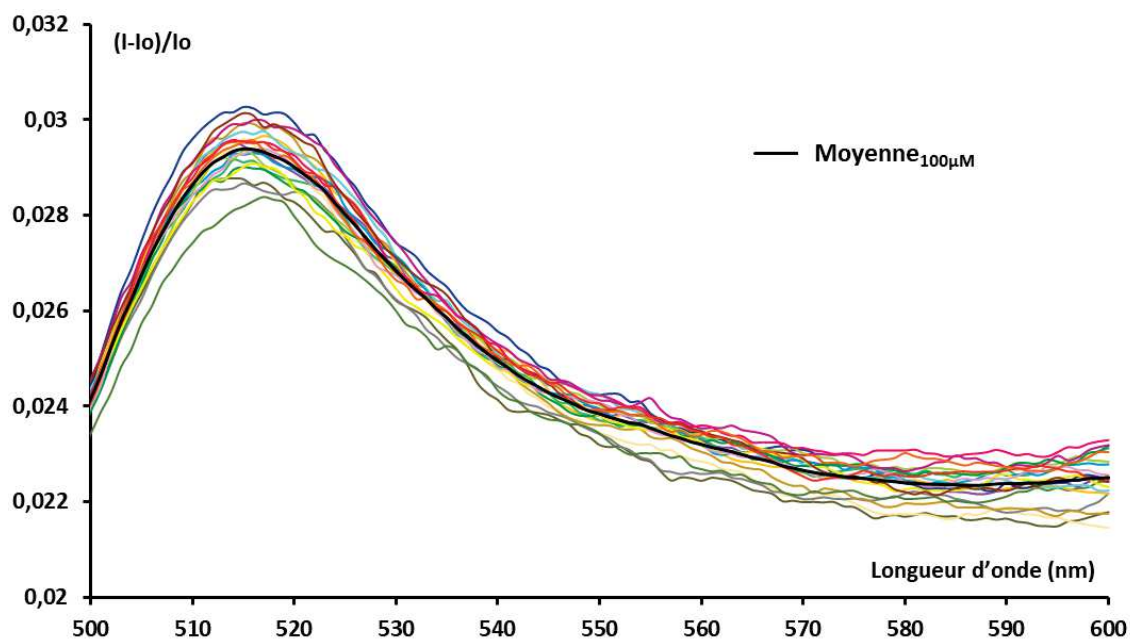


Figure 93 : Courbes de fluorescence et moyenne des 20 mesures de **DIS-2F** en présence de 100 μM de GSH utilisés pour la détermination de la LoD

Elle a été calculée au maximum d'émission ($\lambda = 515 \text{ nm}$) après la mesure de 20 échantillons. L'écart-type ($\sigma_{100\mu\text{M}} = 5,08 \times 10^{-4}$) des intensités a été calculé, et la limite de détection a été déterminée selon la formule :

$$LoD = LoB + 1,645 * \sigma_{100\mu\text{M}} = 2,74 \times 10^{-2}$$

Cette LoD correspond à l'intensité de fluorescence minimale détectable et doit être ramenée à une concentration en glutathion par une courbe de régression.

Chapitre IV : Synthèse d'ARNs contraints par un lien diméthylène disulfure entre les positions 2' de deux nucléosides adjacents

La limite de détection en glutathion (LoD_{GSH}) a donc été calculée en injectant les valeurs de LoB et LoD dans les équations modélisées par la méthode précédente, en considérant $I = LoD$ et $Io = LoB$. La résolution des équations suivantes a ensuite permis le calcul de la LoD_{GSH} . L'équation polynomiale sur la gamme complète (a) et l'équation sur le domaine de linéarité (b) ont été utilisées.

$$a) \frac{LoD - LoB}{LoB} = -3,75 * 10^{-7} * LoD_{GSH}^2 + 4,55 * 10^{-4} * LoD_{GSH} + 7,04 * 10^{-3}$$

$$b) \frac{LoD - LoB}{LoB} = 3,85 * 10^{-4} * LoD_{GSH} + 1,07 * 10^{-2}$$

Une LoD_{GSH} identique de **56 μ M** a été obtenue par les deux méthodes, montrant encore la concordance entre la gamme globale et le domaine de linéarité.

6.4.3. Comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes utilisées

Les deux méthodes ont permis l'obtention de résultats concordants, indiquant une limite de détection d'environ 20 μ M avec la première méthode, et 56 μ M avec la seconde méthode (**Tableau 27**). Notre système possède donc une sensibilité au glutathion à une concentration de l'ordre de dizaines de micromolaires.

	Méthode 1	Méthode 2
Polynomial	24 μ M	56 μ M
Linéaire	20 μ M	56 μ M

Tableau 27 : Bilan des valeurs de limite de détection en glutathion obtenues

Notre « molecular beacon » est moins sensible que les systèmes décrits par Qu *et al.* et Hepel *et al.*, détectant des concentrations de l'ordre du nanomolaire.^{25a, 276} Néanmoins, la limite de détection atteinte reste largement inférieure aux concentrations cellulaires de glutathion, ces dernières étant de l'ordre du millimolaire.

Ce premier modèle, qu'il reste certainement à optimiser, confirme donc que ce lien diméthylène disulfure pourrait avoir une application dans des sondes à agents réducteurs.

7. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit l'influence d'un lien diméthylène disulfure formé entre les positions 2' de deux nucléotides adjacents dans un ARN, soit en structure duplex, soit en structure hairpin.

Ce lien a tout d'abord été introduit dans des structures doubles brins ARN / ARN et ARN / ADN qui ont été fortement déstabilisés ($\Delta T_m > -10$ °C). A l'inverse, le lien à pont disulfure formé dans la partie centrale de la boucle d'une structure d'hairpin induit de meilleures stabilités enzymatique et thermique.

Avec une séquence ARN d'intérêt biologique, le HIV-1 DIS, nous avons montré que le lien diméthylène disulfure bloquait la forme hairpin et empêchait la formation de la forme « extended duplex ». En revanche, en présence d'un agent réducteur, la rupture du pont disulfure engendre la récupération de l'ARN non modifié. Nous avons exploité ces propriétés en préparant un « molecular beacon » avec un fluorophore et un « quencher » à chaque extrémité de la structure pour utiliser le système pour la détection du glutathion. Une limite de détection en glutathion de l'ordre de la dizaine de micromolaires a été déterminée. Cette valeur est inférieure aux systèmes existants et indique que notre système nécessite d'être amélioré. Néanmoins, ces résultats préliminaires démontrent le potentiel du lien diméthylène disulfure pour contraindre un ARN sous une forme hairpin prépondérante, qui pourra être utilisée comme « molecular beacon ».

Une perspective d'amélioration de ce système pourrait être d'utiliser des thiols portés par des liens permanents de type carbamate, comme décrit dans le chapitre III. En effet, en milieu réducteur, les ARNs 2'-OH sont libérés, par élimination du thioformaldéhyde après la rupture du lien diméthylène disulfure, rendant l'ouverture des structures hairpins irréversible. En revanche, si le pont disulfure était porté par un lien carbamate en 2' de l'ARN, la fonction thiol resterait fixée à l'ARN après coupure du pont. Ainsi, les systèmes deviendraient réversibles, c'est-à-dire pouvant s'ouvrir ou se fermer en fonction des conditions réductrices ou oxydantes, ouvrant des perspectives de recherches.

Ces travaux ont été décrits dans une publication parue en 2018 dans le journal *Organic & Biomolecular Chemistry* (en annexe).¹³⁶

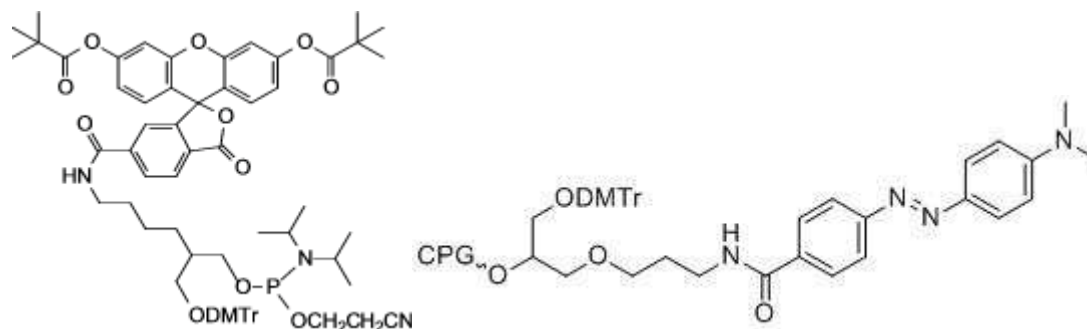
8. Partie expérimentale

General experimental procedures

The general experimental procedures are described in the experimental section of chapter I.

Solid-phase synthesis of RNA oligonucleotides

Labeled **DIS-2F** and **DIS-F** oligonucleotides were synthesized using 5'-fluorescein-CE-phosphoramidite (6-FAM) and 3'-DABCYL CPG as solid support (Link Technologies).



Structures of 5'-fluorescein-CE-phosphoramidite and 3'-DABCYL CPG

The solid-phase synthesis of RNA oligonucleotides is described in the experimental section of chapter I.

Synthesis of 2'-O-AcSM-5'-O-DMTr-3'-O-phosphoramidites nucleosides **10a** and **10c**

The synthesis of the cytidine **10a** and the guanosine **10c** 2'-O-AcSM phosphoramidites are described in the experimental section of chapter I.

Synthesis of 2',2'-disulfide-bridged oligonucleotides **56**, **H4-1**, **H4-2**, **H4-3**, **H5-1**, **H5-2**, **H5-3**, **H5-4**, **DIS-1**, **DIS-2** and **DIS-2F**

After oligonucleotide elongation, the solid support inside the TWIST™ column was treated with 2 mL of 2,2'-dithiodipyridine (20 equiv.) in anhydrous THF / BuNH₂ (95:5, v/v solution). The solution was applied to the synthesis column using two glass syringes filled with 4 Å molecular sieves (5 beads each) and was pushed back and forth through the synthesis column for 30 min. Then, the solution was removed, and the solid support was washed with anhydrous THF followed by a 1 min flush with argon. Finally, the solid support was treated with a 30% aqueous ammonia solution for 3 h at 25 °C. The deprotection solution was evaporated in the presence of isopropylamine (13% of total volume) under reduced pressure. The residue was dissolved in 1.5 mL of water, transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized.

Analysis, purification and desalting

The crude oligonucleotides were analyzed by IEX-HPLC and characterized by MALDI-TOF spectrometry. The crude oligonucleotides were then purified by semi-preparative IEX-HPLC

with a specific linear gradient of buffer B in buffer A. The pure fraction of each oligonucleotide were pooled in a 100 mL round-bottomed flask and were concentrated to dryness under reduced pressure. The residues were dissolved in a 100 mL TEAAc buffer, pH 7 (8 mL divided in three portions for flask rinse: 5 mL, 2 mL, 1 mL) and were loaded on a C₁₈ cartridge (Sep-Pak®, Waters) equilibrated with a 100 mM TEAAc buffer solution. The desired compound was eluted with 10 mL of a 12.5 mM TEAAc / CH₃CN (1:1, v/v) solution in a 50 mL round-bottomed flask and was lyophilized. The residue was dissolved in 1.5 mL water (divided in 3 portions 0.8 mL, 0.4 mL and 0.3 mL for flask rinsing), transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized. Purified RNAs were analysed by IEX-HPLC, characterized by MALDI-TOF MS and quantified by UV measurement. Lyophilized RNAs were stored at -20 °C for several months without any degradation.

Thermal denaturation experiments

T_m experiments were performed using a CARY 300 UV Spectrophotometer (Varian Inc.) equipped with a Peltier temperature controller and thermal analysis software. The samples were prepared by mixing oligonucleotide solutions to give 1.5 μM final concentrations in 1 mL of buffer (10 mM Na cacodylate, 100 mM NaCl, pH 7 for oligonucleotides **56**, **H4-1** to **H4-3** and **H5-1** to **H5-4**, 20 mM Na cacodylate, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7 for **DIS** sequences) in a 1 cm path length quartz cell. A heating-cooling-heating cycle in the 0–90 °C temperature range with a 0.5 °C min⁻¹ gradient was applied. *T_m* values were determined from the maxima of the first derivative plots of the absorbance versus temperature. The *T_m* values from two independent experiments were accurate within ± 0.5 °C. The solutions were stored in 2 mL Eppendorf vials at -80 °C.

Gel electrophoresis experiments

80 μM solutions of RNAs **H4** to **H4-3** and **H5** to **H5-4** were prepared in deionized water. For each RNA, aliquots were withdrawn, lyophilized and redissolved in Na-cacodylate 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7 (20 μL) to obtain 5 μM solutions. All samples were denatured by heating at 90 °C for 3–5 min followed by cooling to room temperature overnight; the samples were then kept at 4 °C for 3 h and diluted with formamide (20 μL). Each sample was analysed by gel electrophoresis (15% polyacrylamide, TBE buffer 1×, 37 °C). The gels were stained with GelRed 3× (VWR) in a 0.1 M NaCl solution for 1 h and revealed using a UV transilluminator.

80 μM solutions of **DIS** sequences were prepared in deionized water. For each RNA, aliquots were withdrawn, lyophilized and redissolved in 25 mM KCl, 2 mM MgCl₂, and 25 mM Na-cacodylate pH 7 (20 μL) to obtain 5 μM solutions. All samples were denatured by heating at 90 °C for 3–5 min followed by cooling to room temperature overnight; the samples were then kept at 4 °C for 3 h and diluted with formamide (20 μL). Each sample was analysed by gel electrophoresis (15% polyacrylamide, Tris borate MgCl₂ (TBM) buffer 1×, 37 °C). The gels were stained with GelRed 3× (VWR) in a 0.1 M NaCl solution for 1 h and revealed using a UV transilluminator.

CD spectroscopy studies

CD spectra were recorded on a Jasco J-815 spectropolarimeter. The solutions used for T_m experiments were transferred into a 1 cm path length quartz cell. Measurements were performed at 1 °C with the wavelength range set to 340–200 nm and a scanning speed of 100 nm.min⁻¹. Raw data were acquired over 2 scans.

SVPDE stability assay

The stability of RNA hairpins was evaluated by gel electrophoresis. Hairpins solutions (2.4 nmol, C = 77 μM, V = 31.1 μL) were diluted with an ammonium citrate solution (450 mM, 8.9 μL) and incubated with snake venom phosphodiesterase (2 mU, 10 μL) at 37 °C. At different incubation times, aliquots (3 μL) were withdrawn, immediately frozen and stored at -80 °C until analysis. Each sample was then analysed by gel electrophoresis (15% polyacrylamide, 4 °C, TBE buffer). The gels were stained with GelRed 3× (VWR) in a 0.1 M NaCl solution for 1 h and revealed using a UV transilluminator. Band analysis was performed using the ImageJ Software (Broken Symmetry Software V:1.4.3.67). Half-lives were determined by the hypothesis of first-order kinetics, and the calculations were performed on Microsoft Office Excel with an exponential trend line given by $y(t) = Ae^{(-kt)}$ ($0.95 \leq R^2 \leq 1.00$).

Fluorescence measurements

Fluorescence emission spectra were recorded using a Jasco J-815 spectropolarimeter at 25 °C from 400 to 600 nm, with the excitation wavelength of 494 nm in a 100 μL quartz cell with a 1 cm light path. Raw data were acquired over 2 scans.

For TCEP experiments, a 100 μM **DIS-2F** or **DIS-F** solution was prepared in deionized water. A 4 μM solution was prepared from this 100 μM solution (20 μL) in the buffer (480 μL, 20 mM sodium cacodylate, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7). This **DIS-2F** or **DIS-F** solution (50 μL) was mixed with **DIS** solutions (50 μL) at different concentrations in the buffer (4 μM / 8 μM / 20 μM / 40 μM) to obtain a 2 μM solution used for analyses. The buffered **DIS-2F** or **DIS-F** solution (50 μL) was also mixed with the buffer only (50 μL) to be used as a reference (I₀). These solutions were then denatured by heating at 90 °C for 3 min followed by slow cooling to 37 °C overnight. The **DIS** to **DIS-2F** or **DIS-F** ratios ranged from 1 to 10, corresponding to the non-labeled RNA concentration from 2 to 20 μM in the final solution. After analysis, 2 μL of a 50 mM TCEP solution were added to all **DIS-2F** solutions (including I₀). The solutions were left for 2 minutes in the presence of TCEP at room temperature before denaturation by heating at 90 °C for 3 min followed by cooling to 37 °C for 2 h.

For glutathione experiments, 100 μM **DIS-2F** and 105 μM **DIS** solutions were prepared in deionized water. **DIS-2F** solution (2 μL) was mixed with **DIS** solution (19 μL) and glutathione - free buffer (79 μL, 20 mM sodium cacodylate, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7) to be used as the reference. **DIS-2F** solution (2 μL) was mixed with **DIS** solution (19 μL) and glutathione buffer (79 μL, 20 mM sodium cacodylate, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 127 nM / 1.27 μM / 12.7

μM / 127 μM / 1.27 mM glutathione, pH 7) to obtain the final glutathione solutions of 100 nM / 1 μM / 10 μM / 30 μM / 60 μM / 100 μM / 1 mM. All solutions were prepared in triplicate. These solutions were left for 5 min at room temperature before heating at 90 °C for 5 min followed by slow cooling to 25 °C overnight prior to the analysis.

HPLC analyses

N°	Number of CH ₂ -S-S-CH ₂	Temperature	Gradient (% of B buffer) ^a	Retention time (min)
56	1	30 °C	0 to 50 % in 20 min	16,6
H4-1	1	75 °C	0 to 80 % in 20 min	15,1
H4-2	1	75 °C	0 to 60 % in 20 min	17,1
H4-3	1	75 °C	0 to 100 % in 20 min	12,6
H5-1	1	75 °C	0 to 60 % in 20 min	18,4
H5-2	1	75 °C	0 to 100 % in 20 min	15,6
H5-3	1	75 °C	0 to 100 % in 20 min	12,5
H5-4	2	75 °C	0 to 100 % in 20 min	13,1
DIS-1	1	75 °C	0 to 60 % in 20 min	17,8
DIS-2	1	75 °C	0 to 60 % in 20 min	17,8
DIS-2F	1	75 °C	0 to 60 % in 20 min	17,7
DIS-F	1	75 °C	0 to 80 % in 20 min	16,4

^aIEX-HPLC analysis : Dionex DNAPac Pa100, 4x250 mm, buffer A : 20% CH₃CN in 25 mM Tris HCl pH 8, Buffer B : 20% CH₃CN containing 200 mM NaClO₄ in 25 mM Tris HCl pH 8, flow rate : 1 mL / min, detection at 260 nm, Temperature of analysis : 30 °C

Conclusion générale

L'objectif de ces travaux de thèse était d'utiliser la chimie des ponts disulfures pour modifier la position 2'-OH du ribose dans des ARNs, afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique d'ARNs interférents, de conjuguer des molécules variées mais aussi d'étudier leur structure secondaire.

Le premier chapitre a été consacré à la synthèse et à l'étude de prodrogues d'ARNs interférents partiellement modifiés en position 2' par des groupements benzyldithiométhyles (BnSSM), ciblant le sarcome d'Ewing.

La synthèse de nouveaux phosphoramidites des quatre ribonucléotides modifiés en position 2' par des groupements acétylthiométhyles (AcSM) a été décrite. La formation des ponts disulfures a été effectuée par une réaction d'échange thiol-disulfure sur support solide entre un thiolate, généré par l'attaque du thioester (AcSM) par la butylamine, et un réactif benzyldisulfanylpyridine. Huit ARNs partiellement modifiés portant entre trois et sept modifications BnSSM en différentes positions des brins sens et antisens ont ainsi été obtenus. Leur capacité à former des duplex stables thermiquement et la conservation de la structure de l'hélice d'ARN ont été démontrées. L'évaluation de la stabilité enzymatique en présence de sérum a mis en évidence huit siARNs modifiés présentant une stabilité enzymatique nettement supérieure à celle du duplex non modifié. Enfin, le démasquage des siARNs 2'-O-BnSSM en milieu réducteur a été confirmé, avec néanmoins une vitesse de formation du 2'OH dépendante de la position des groupements BnSSM sur le duplex.

L'évaluation biologique a démontré que les huit siARNs sont capables d'inhiber la production de la protéine EWS-Fli1 en présence d'agents de transfection, préjugant d'un démasquage effectif des siARNs dans le cytoplasme. Sans agent de transfection, le duplex comportant sept groupements BnSSM sur le brin sens et un brin antisens non modifié s'est révélé le plus efficace. Il inhibe 50% de l'expression de la protéine cible, corroborée par une amélioration de la pénétration cellulaire observée par microscopie de fluorescence. Deux autres siARNs avec ce même brin sens ont démontré une activité stable à 24 h et 48 h, probablement due à un démasquage lent. L'ensemble de ces résultats a confirmé que les siARNs modifiés par les groupements BnSSM remplissent les critères requis pour être considérés comme des prodrogues de siARNs. Des tests cellulaires à plus long terme pourraient être envisagés pour évaluer si une inhibition prolongée serait observée.

Le deuxième chapitre décrit la conjugaison de siARNs à la doxorubicine par des liens covalents auto-immolables dans une approche de co-délivrance.

Dans un premier temps, la synthèse de la doxorubicine modifiée et des liens contenant deux ponts disulfures, aliphatique ou aromatique, a été explicitée. Ces liens ont été incorporés à l'extrémité 5' ou en milieu de séquence du brin sens du siARN du sarcome d'Ewing.

Dans un second temps, le couplage en solution de la doxorubicine sur les ARNs modifiés a été mis en œuvre par une méthode en deux étapes. La synthèse d'un ARN conjugué à deux doxorubicines a également été réalisée pour démontrer la possibilité de multi-conjugaison. La stabilité enzymatique de cinq siARNs conjugués à la doxorubicine en présence de sérum a été

améliorée par rapport à celle du duplex non modifié. Enfin, le traitement des conjugués en milieu réducteur a démontré la libération de l'ARN 2'OH et de la doxorubicine non modifiés, validant le caractère auto-immolable des liens utilisés. L'étape suivante sera l'évaluation de l'activité inhibitrice et cytotoxique des siARNs conjugués à la doxorubicine sur les cellules du sarcome d'Ewing, pour vérifier si cette stratégie de co-délivrance engendre des effets synergiques favorables à l'élimination des cellules cancéreuses.

Le troisième chapitre décrit le développement de nouvelles méthodes de conjugaison de petites molécules sur des ARNs en position 2' au travers d'un pont disulfure.

Dans une première partie, la synthèse d'un synthon phosphoramidite de l'uridine modifié en position 2' par un lien *N*-2-(acétylthio)-éthylcarbamate et son incorporation au sein d'un ARN ont été décrites. Un groupement disulfanylpyridine a été introduit sur l'ARN supporté par réaction d'échange thiol-disulfure. De plus, un ARN comportant deux uridines modifiées comme sites de conjugaison a également été synthétisé, pour confirmer la possibilité d'effectuer des conjugaisons multiples.

Dans une seconde partie, deux stratégies complémentaires de conjugaison en solution ont été présentées. D'une part, des biomolécules disponibles dans le commerce avec une fonction thiol ont été couplées directement en solution par réaction sur le pont disulfure activé de l'ARN. D'autre part, un résidu disulfanylpyridyl a été introduit sur les biomolécules non disponibles avec une fonction thiol. Dans un second temps, la réduction du groupe S-SPyridine en thiolate a permis la conjugaison à l'ARN par échange thiol-disulfure. Enfin, le suivi en milieu réducteur des différents ARNs conjugués a confirmé la libération très rapide des biomolécules par coupure du pont disulfure.

Plusieurs améliorations peuvent encore être apportées à cette méthode de conjugaison. La synthèse des phosphoramidites des autres nucléosides (A, C et G) permettrait d'effectuer des couplages en toute position de la séquence, et des études en milieu biologique seraient utiles pour évaluer l'amélioration potentielle de l'adressage ou de la pénétration cellulaire par exemple, selon les biomolécules fixées aux ARNs.

Enfin, le quatrième chapitre traite de l'étude structurale d'ARNs modifiés par un lien diméthylène disulfure formé entre les positions 2' de deux nucléotides adjacents.

Tout d'abord, l'introduction de ce lien entre deux nucléotides au centre d'un ARN associé à son brin complémentaire dans un duplex provoque une déstabilisation thermique importante du duplex, indiquant son incompatibilité dans des structures double brins.

Le lien diméthylène disulfure a aussi été introduit dans la partie boucle non appariée d'une hairpin ARN. Plusieurs ARNs modifiés ont été synthétisés, et la stabilité des différentes structures en hairpin a été comparée en fonction de la position du lien dans la boucle. Positionné au centre de la boucle, le lien stabilise la structure thermiquement mais aussi enzymatiquement.

Ces résultats préliminaires nous ont conduits à étudier l'effet de ce lien dans un ARN d'intérêt biologique, le HIV-1 DIS, connu pour évoluer d'une forme hairpin à une forme « extended

duplex » par le mécanisme d'initiation de dimérisation, engendré par l'appariement de nucléotides présents dans les parties boucles de deux hairpins. L'introduction du lien diméthylène disulfure dans cette boucle a permis de bloquer la forme hairpin et d'améliorer la stabilité enzymatique de l'ARN. En revanche, en milieu réducteur, le pont disulfure est coupé, restaurant l'ARN natif qui évolue vers la forme « extended duplex ». Enfin, un « molecular beacon » a été développé, confirmant le potentiel de ce lien pour contraindre des structures secondaires d'oligonucléotides. Une application de ce système comme sonde à agents réducteurs a été mise en œuvre, permettant de détecter des concentrations en glutathion nettement inférieures (micromolaires) à celles rencontrées en milieu cellulaire (millimolaires).

Finalement, une perspective d'amélioration de cette sonde serait de la combiner à la méthode de conjugaison présentée dans le chapitre III. En effet, l'élimination du thioformaldéhyde rend irréversible la coupure du lien diméthylène disulfure, et permet donc uniquement l'évolution du système vers l' « extended duplex ». En revanche, la fonction thiol portée par un lien *N*-éthylcarbamate en position 2' de l'ARN reste en place après réduction du pont disulfure, et pourrait servir à l'étude de systèmes réversibles, basés sur des ARNs dont la structure varie en fonction des conditions oxydantes ou réductrices.

Bibliographie

Bibliographie

1. Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 737.
2. Belmont, P.; Constant, J.-F.; Demeunynck, M., Nucleic acid conformation diversity: from structure to function and regulation. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30* (1), 70-81.
3. Manoharan, M., Oligonucleotide conjugates as potential antisense drugs with improved uptake, biodistribution, targeted delivery, and mechanism of action. *Antisense Nucleic Acid Drug. Dev.* **2002**, *12* (2), 103-128.
4. Opalinska, J. B.; Gewirtz, A. M., Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, *1* (7), 503-514.
5. Lander, E. S., The Heroes of CRISPR. *Cell* **2016**, *164* (1-2), 18-28.
6. (a) Doudna, J. A.; Charpentier, E., The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **2014**, *346* (6213), 1258096-12580969; (b) Hsu, P. D.; Lander, E. S.; Zhang, F., Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* **2014**, *157* (6), 1262-1278.
7. Crooke, S. T., Progress in antisense technology. *Annu. Rev. Med.* **2004**, *55*, 61-95.
8. Winkler, J., Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. *Ther. Deliv.* **2013**, *4* (7), 791-809.
9. (a) Zhou, J.; Shum, K.-T.; Burnett, J. C.; Rossi, J. J., Nanoparticle-Based Delivery of RNAi Therapeutics: Progress and Challenges. *Pharmaceuticals* **2013**, *6* (1), 85-107; (b) Shen, X.; Corey, D. R., Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (4), 1584-1600.
10. de Smet, M. D.; Meenken, C. J.; van den Horn, G. J., Fomivirsen - a phosphorothioate oligonucleotide for the treatment of CMV retinitis. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **1999**, *7* (3-4), 189-198.
11. (a) Van Aerschot, A., Oligonucleotides as antivirals: dream or realistic perspective? *Antiviral Res.* **2006**, *71* (2-3), 307-316; (b) Khvorovova, A.; Watts, J. K., The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35* (3), 238-248.
12. (a) Karaki, S.; Benizri, S.; Mejías, R.; Baylot, V.; Branger, N.; Nguyen, T.; Vialet, B.; Oumzil, K.; Barthélémy, P.; Rocchi, P., Lipid-oligonucleotide conjugates improve cellular uptake and efficiency of TCTP-antisense in castration-resistant prostate cancer. *J. Controlled Release* **2017**, *258*, 1-9; (b) Luger, S. M.; O'Brien, S. G.; Ratajczak, J.; Ratajczak, M. Z.; Mick, R.; Stadtmauer, E. A.; Nowell, P. C.; Goldman, J. M.; Gewirtz, A. M., Oligodeoxynucleotide-mediated inhibition of cmyb gene expression in autografted bone marrow: a pilot study. *Blood* **2002**, *99* (4), 1150-1158; (c) Andrews, D. W.; Resnicoff, M.; Flanders, A. E.; Kenyon, L.; Curtis, M.; Merli, G.; Baserga, R.; Iliakis, G.; Aiken, R. D., Results of a pilot study involving the use of an antisense oligodeoxynucleotide directed against the insulin-like growth factor type I receptor in malignant astrocytomas. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19* (8), 2189-2200.
13. (a) Haussecker, D.; Kay, M. A., RNA interference. Drugging RNAi. *Science* **2015**, *347* (6226), 1069-1070; (b) Wittrup, A.; Lieberman, J., Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16* (9), 543-552.
14. Ledford, H., Gene-silencing technology gets first drug approval after 20-year wait. *Nature* **2018**, *560* (7718), 291-292.

15. (a) Latorre, A.; Latorre, A.; Somoza, A., Modified RNAs in CRISPR/Cas9: An Old Trick Works Again. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (11), 3548-3550; (b) Bell, N. M.; Micklefield, J., Chemical modification of oligonucleotides for therapeutic, bioanalytical and other applications. *Chembiochem* **2009**, *10* (17), 2691-2703.
16. Singh, Y.; Murat, P.; Defrancq, E., Recent developments in oligonucleotide conjugation. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (6), 2054-2070.
17. Manoharan, M., 2'-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489* (1), 117-130.
18. K. Singh, S.; A. Koshkin, A.; Wengel, J.; Nielsen, P., LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chemical Communications* **1998**, (4), 455-456.
19. Straarup, E. M.; Fisker, N.; Hedtjarn, M.; Lindholm, M. W.; Rosenbohm, C.; Aarup, V.; Hansen, H. F.; Orum, H.; Hansen, J. B.; Koch, T., Short locked nucleic acid antisense oligonucleotides potently reduce apolipoprotein B mRNA and serum cholesterol in mice and non-human primates. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (20), 7100-7111.
20. Nair, J. K.; Willoughby, J. L. S.; Chan, A.; Charisse, K.; Alam, M. R.; Wang, Q.; Hoekstra, M.; Kandasamy, P.; Kel'in, A. V.; Milstein, S.; Taneja, N.; O'Shea, J.; Shaikh, S.; Zhang, L.; van der Sluis, R. J.; Jung, M. E.; Akinc, A.; Hutabarat, R.; Kuchimanchi, S.; Fitzgerald, K.; Zimmermann, T.; van Berkel, T. J. C.; Maier, M. A.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M., Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (49), 16958-16961.
21. Wang, M.; Jiang, X., Sulfur-Sulfur Bond Construction. *Top. Curr. Chem. (Cham.)* **2018**, *376* (2), 14.
22. Singh, R.; Whitesides, G. M., Thiol-disulfide interchange. In *The chemistry of sulphur-containing functional groups*, Patai, S.; Rappoport, Z., Eds. John Wiley & Sons Ltd: 1993; pp 633-657.
23. Saito, G.; Swanson, J. A.; Lee, K.-D., Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2003**, *55* (2), 199-215.
24. (a) Estrela, J. M.; Ortega, A.; Obrador, E., Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2006**, *43* (2), 143-181; (b) Scibior, D.; Skrzycki, M.; Podsiad, M.; Czczot, H., Glutathione level and glutathione-dependent enzyme activities in blood serum of patients with gastrointestinal tract tumors. *Clin. Biochem.* **2008**, *41* (10-11), 852-858; (c) R., P. R.; Joann, M.; Mark, L.; C., B. S., Glutathione levels and variability in breast tumors and normal tissue. *Cancer* **1993**, *72* (3), 783-787.
25. (a) Guo, Y.; Wang, H.; Sun, Y.; Qu, B., A disulfide bound-molecular beacon as a fluorescent probe for the detection of reduced glutathione and its application in cells. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (26), 3221-3223; (b) Piggott, A. M.; Karuso, P., Fluorometric assay for the determination of glutathione reductase activity. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (22), 8769-8773; (c) Pullela, P. K.; Chiku, T.; Carvan, M. J., 3rd; Sem, D. S., Fluorescence-based detection of thiols in vitro and in vivo using dithiol probes. *Anal. Biochem.* **2006**, *352* (2), 265-273; (d) Reddie, K. G.; Humphries, W. H.; Bain, C. P.; Payne, C. K.; Kemp, M. L.; Murthy, N., Fluorescent coumarin thiols measure biological redox couples. *Org. Lett.* **2012**, *14* (3), 680-683; (e) Lee, M. H.; Yang, Z.; Lim, C. W.; Lee, Y. H.; Dongbang, S.; Kang, C.; Kim, J. S., Disulfide-

- Cleavage-Triggered Chemosensors and Their Biological Applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (7), 5071-5109.
26. (a) Yin, B.-C.; You, M.; Tan, W.; Ye, B.-C., Mercury(II) Ions Detection via Pyrene-Mediated Photolysis of Disulfide Bonds. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2012**, *18* (5), 1286-1289; (b) Pujol, A. M.; Cuillel, M.; Renaudet, O.; Lebrun, C.; Charbonnier, P.; Cassio, D.; Gateau, C.; Dumy, P.; Mintz, E.; Delangle, P., Hepatocyte targeting and intracellular copper chelation by a thiol-containing glycocyclopeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (2), 286-296.
27. De Stefano, M.; Vesterager Gothelf, K., Dynamic Chemistry of Disulfide Terminated Oligonucleotides in Duplexes and Double-Crossover Tiles. *ChemBioChem* **2016**, *17* (12), 1122-1126.
28. (a) Li, D.; Wang, X.; Shi, F.; Sha, R.; Seeman, N. C.; Canary, J. W., Templated DNA ligation with thiol chemistry. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (44), 8823-8827; (b) Lesage, D.; Metelev, V.; Borisova, O.; Dolinnaya, N.; Oretskaya, T.; Baran-Marszak, F.; Taillandier, E.; Raphael, M.; Fagard, R., Specific covalent binding of a NF- κ B decoy hairpin oligonucleotide targeted to the p50 subunit and induction of apoptosis. *FEBS Lett.* **2003**, *547* (1), 115-118.
29. Patzke, V.; McCaskill, J. S.; von Kiedrowski, G., DNA with 3'-5'-Disulfide Links—Rapid Chemical Ligation through Isosteric Replacement. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (16), 4222-4226.
30. Hansen, D. J.; Manuguerra, I.; Kjelstrup, M. B.; Gothelf, K. V., Synthesis, Dynamic Combinatorial Chemistry, and PCR Amplification of 3'-5' and 3'-6' Disulfide-linked Oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (52), 14415-14418.
31. C. W. Bradshaw, L. E., A. Kabakibi, S. Lam, B. Liu, D. Liu, B. R. Meade, S. Sakamuri WO2015069932 (A1) Polynucleotide constructs having disulfide groups. 2015.
32. Amarzguioui, M.; Holen, T.; Babaie, E.; Prydz, H., Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (2), 589-595.
33. Fidanza, J. A.; McLaughlin, L. W., Use of a thiol tether for the site-specific attachment of reporter groups to DNA. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (8), 2340-2346.
34. Endo, M.; Majima, T., Structural arrangement of two DNA double helices using cross-linked oligonucleotide connectors. *Chem. Commun.* **2004**, (11), 1308-1309.
35. Endo, M.; Majima, T., Structural arrangement of DNA constrained by a cross-linker. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (19), 3476-3478.
36. Gryaznov, S. M.; Letsinger, R. L., Template controlled coupling and recombination of oligonucleotide blocks containing thiophosphoryl groups. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21* (6), 1403-1408.
37. (a) Gao, H.; Yang, M.; Patel, R.; Cook, A. F., Circulation of oligonucleotides by disulfide bridge formation. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23* (11), 2025-2029; (b) Gao, H.; Yang, M.; Cook, A. F., Stabilization of double-stranded oligonucleotides using backbone-linked disulfide bridges. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23* (2), 285-292.
38. Pérez-Rentero, S.; Grijalvo, S.; Ferreira, R.; Eritja, R., Synthesis of Oligonucleotides Carrying Thiol Groups Using a Simple Reagent Derived from Threoninol. *Molecules* **2012**, *17* (9), 10026-10045.
39. Lipsett, M. N., Disulfide Bonds in sRNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1966**, *31*, 449-455.

40. (a) Osborne, S. E.; Volker, J.; Stevens, S. Y.; Breslauer, K. J.; Glick, G. D., Design, synthesis, and analysis of disulfide cross-linked DNA duplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (48), 11993-12003; (b) Glick, G. D., Design, synthesis, and analysis of conformationally constrained nucleic acids. *Biopolymers* **1998**, *48* (1), 83-96.
41. (a) Glick, G. D.; Osborne, S. E.; Knitt, D. S.; Marino, J. P., Trapping and isolation of an alternate DNA conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (13), 5447-5448; (b) Milton, J.; Connolly, B. A.; Nikiforovc, T. T.; Cosstick, R., Site-specific disulfide bridges in oligodeoxyribonucleotide duplexes containing 6-mercaptapurine and 4-thiothymine bases. *J. Chem. Soc., Chem. Commun* **1993**, (9), 779-780.
42. Osborne, S. E.; Ellington, A. D., Incorporating disulfide cross-links at the terminus of oligonucleotides via solid-phase nucleic acid synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6* (19), 2339-2342.
43. Sun, S.; Tang, X.-Q.; Merchant, A., Efficient Synthesis of 5-(Thioalkyl)uridines via Ring Opening of α -Ureidomethylene Thiolactones. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (17), 5708-5709.
44. (a) Hou, X.; Wang, G.; Gaffney, B.; Jones, R., Synthesis of Guanosine and Deoxyguanosine Phosphoramidites with Cross-Linkable Thioalkyl Tethers for Direct Incorporation into RNA and DNA. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2009**, *28* (11-12), 1076-1094; (b) Xiaorong, H.; Gang, W.; Barbara, G.; Roger, J., Preparation of DNA and RNA Fragments Containing Guanine N2-Thioalkyl Tethers. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* **2010**, *41* (1), 5.8.1-5.8.23; (c) Gundlach Iv, C. W.; Ryder, T. R.; Glick, G. D., Synthesis of guanosine analogs bearing pendant alkylthiol tethers. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (23), 4039-4042.
45. (a) Ferentz, A. E.; Verdine, G. L., Disulfide-crosslinked oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (10), 4000-4002; (b) Macmillan, A. M.; Verdine, G. L., Engineering tethered DNA molecules by the convertible nucleoside approach. *Tetrahedron* **1991**, *47* (14), 2603-2616; (c) MacMillan, A. M.; Verdine, G. L., Synthesis of functionally tethered oligodeoxynucleotides by the convertible nucleoside approach. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (24), 5931-5933; (d) Ferentz, A. E.; Verdine, G. L., Aminolysis of 2'-Deoxyinosine Aryl Ethers: Nucleoside Model Studies for the Synthesis of Functionally Tethered Oligonucleotides. *Nucleos. Nucleot.* **1992**, *11* (10), 1749-1763; (e) Macmillan, A. M.; Verdine, G. L., Engineering tethered DNA-molecules by the convertible nucleoside approach. *Tetrahedron* **1991**, *47* (14-15), 2603-2616; (f) Allerson, C. R.; Chen, S. L.; Verdine, G. L., A Chemical Method for Site-Specific Modification of RNA: The Convertible Nucleoside Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (32), 7423-7433.
46. Yao-Zhong, X.; Qinguo, Z.; Swann, P. F., Synthesis and duplex stability of oligodeoxynucleotides containing 6-mercaptapurine. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33* (39), 5837-5840.
47. Allerson, C. R.; Verdine, G. L., Synthesis and biochemical evaluation of RNA containing an intrahelical disulfide crosslink. *Chem. Biol.* **1995**, *2* (10), 667-675.
48. (a) Erlanson, D. A.; Chen, L.; Verdine, G. L., DNA methylation through a locally unpaired intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (26), 12583-12584; (b) Ferentz, A. E.; Keating, T. A.; Verdine, G. L., Synthesis and characterization of disulfide cross-linked oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (20), 9006-9014.
49. (a) Huang, H.; Harrison, S. C.; Verdine, G. L., Trapping of a catalytic HIV reverse transcriptase-template:primer complex through a disulfide bond. *Chem. Biol.* **2000**, *7* (5), 355-364; (b) He, C.; Verdine, G. L., Trapping Distinct Structural States of a Protein/DNA Interaction through Disulfide Crosslinking. *Chem. Biol.* **2002**, *9* (12), 1297-1303.

50. Timofei, S. Z.; Dolinnaya, N. G.; Elena, A. K.; Marina, G. I.; Metelev, V. G.; Tat'yana, S. O., Covalent binding of modified nucleic acids to proteins as a method for investigation of specific protein–nucleic acid interactions. *Russ. Chem. Rev.* **2005**, *74* (1), 77–95.
51. Paalman, S. R.; Noll, D. M.; Clarke, N. D., Formation of a covalent complex between methylguanine methyltransferase and DNA via disulfide bond formation between the active site cysteine and a thiol-containing analog of guanine. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (9), 1795-1801.
52. (a) Peletskaya, E. N.; Boyer, P. L.; Kogon, A. A.; Clark, P.; Kroth, H.; Sayer, J. M.; Jerina, D. M.; Hughes, S. H., Cross-linking of the fingers subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase to template-primer. *J. Virol.* **2001**, *75* (19), 9435-9445; (b) Gao, K.; Butler, S. L.; Bushman, F., Human immunodeficiency virus type 1 integrase: arrangement of protein domains in active cDNA complexes. *EMBO J.* **2001**, *20* (13), 3565-3576.
53. Coleman, R. S.; McCary, J. L.; Perez, R. J., Thionucleoside disulfides as covalent constraints of DNA conformation. *Tetrahedron* **1999**, *55* (41), 12009-12022.
54. (a) Gyssels, E.; Carrette, L. L. G.; Vercruyse, E.; Stevens, K.; Madder, A., Triplex Crosslinking through Furan Oxidation Requires Perturbation of the Structured Triple-Helix. *ChemBioChem* **2015**, *16* (4), 651-658; (b) Cain, R. J.; Glick, G. D., Use of Cross-Links To Study the Conformational Dynamics of Triplex DNA. *Biochemistry* **1998**, *37* (5), 1456-1464.
55. (a) Hoogsteen, K., The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallogr.* **1963**, *16* (9), 907-916; (b) Tateishi-Karimata, H.; Nakano, M.; Sugimoto, N., Comparable Stability of Hoogsteen and Watson–Crick Base Pairs in Ionic Liquid Choline Dihydrogen Phosphate. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 3593.
56. Chaudhuri, N. C.; Kool, E. T., Very High Affinity DNA Recognition by Bicyclic and Cross-Linked Oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (42), 10434-10442.
57. Rogers, F. A.; Manoharan, M.; Rabinovitch, P.; Ward, D. C.; Glazer, P. M., Peptide conjugates for chromosomal gene targeting by triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (22), 6595-6604.
58. (a) Corey, D. R., Synthesis of oligonucleotide-peptide and oligonucleotide-protein conjugates. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *283*, 197-206; (b) Antopolsky, M.; Azhayeva, E.; Tengvall, U.; Auriola, S.; Jääskeläinen, I.; Rönkkö, S.; Honkakoski, P.; Urtili, A.; Lönnberg, H.; Azhayev, A., Peptide–Oligonucleotide Phosphorothioate Conjugates with Membrane Translocation and Nuclear Localization Properties. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10* (4), 598-606; (c) Rogers, Y.-H.; Jiang-Baucom, P.; Huang, Z.-J.; Bogdanov, V.; Anderson, S.; Boyce-Jacino, M. T., Immobilization of Oligonucleotides onto a Glass Support via Disulfide Bonds: A Method for Preparation of DNA Microarrays. *Anal. Biochem.* **1999**, *266* (1), 23-30; (d) Gupta, K. C.; Sharma, P.; Kumar, P.; Sathyanarayana, S., A general method for the synthesis of 3'-sulfhydryl and phosphate group containing oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19* (11), 3019-3025; (e) Bonfils, E.; Thuong, N. T., Solid phase synthesis of 5',3'-bifunctional oligodeoxyribonucleotides bearing a masked thiol group at the 3'-end. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (26), 3053-3056; (f) Asseline, U.; Bonfils, E.; Kurfürst, R.; Chassignol, M.; Roig, V.; Thuong, N. T., Solid-phase preparation of 5',3'-heterobifunctional oligodeoxyribonucleotides using modified solid supports. *Tetrahedron* **1992**, *48* (7), 1233-1254; (g) Zuckermann, R.; Corey, D.; Schultz, P., Efficient methods for attachment of thiol specific probes to the 3'-ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15* (13), 5305-5321.

59. Gaur, R. K.; Sharma, P.; Gupta, K. C., A simple method for the introduction of thiol group at 5'-termini of oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17* (11), 4404.
60. Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques* (Third Edition). *Boston Academic Press* **2013**.
61. Prater, C. E.; Miller, P. S., 3'-Methylphosphonate-Modified Oligo-2'-O-methylribonucleotides and Their Tat Peptide Conjugates: Uptake and Stability in Mouse Fibroblasts in Culture. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15* (3), 498-507.
62. (a) Eritja, R.; Pons, A.; Escarcellar, M.; Giralt, E.; Albericio, F., Synthesis of defined peptide-oligonucleotide hybrids containing a nuclear transport signal sequence. *Tetrahedron* **1991**, *47* (24), 4113-4120; (b) Maurel, F.; Debart, F.; Cavelier, F.; Thierry, A. R.; Lebleu, B.; Vasseur, J.-J.; Vivès, E., Toward high yield synthesis of peptide-oligonucleotide chimera through a disulfide bridge: A simplified method for oligonucleotide activation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (22), 5084-5087.
63. Kuijpers, W. H. A.; van Boeckel, C. A. A., A new strategy for the solid-phase synthesis of 5'-thiolated oligodeoxynucleotides. *Tetrahedron* **1993**, *49* (47), 10931-10944.
64. (a) Vivès, E.; Lebleu, B., Selective coupling of a highly basic peptide to an oligonucleotide. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (7), 1183-1186; (b) Astriab-Fisher, A.; Sergueev, D. S.; Fisher, M.; Shaw, B. R.; Juliano, R. L., Antisense inhibition of P-glycoprotein expression using peptide-oligonucleotide conjugates. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60* (1), 83-90; (c) Bongartz, J. P.; Aubertin, A. M.; Milhaud, P. G.; Lebleu, B., Improved biological activity of antisense oligonucleotides conjugated to a fusogenic peptide. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (22), 4681-4688; (d) Turner, J. J.; Arzumanov, A. A.; Gait, M. J., Synthesis, cellular uptake and HIV-1 Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (1), 27-42; (e) Chen, C.-P.; Zhang, L.-R.; Peng, Y.-F.; Wang, X.-B.; Wang, S.-Q.; Zhang, L.-H., A concise method for the preparation of peptide and arginine-rich peptide-conjugated antisense oligonucleotide. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14* (3), 532-538.
65. Muratovska, A.; Eccles, M. R., Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett.* **2004**, *558* (1-3), 63-68.
66. Margus, H.; Padari, K.; Pooga, M., Cell-penetrating peptides as versatile vehicles for oligonucleotide delivery. *Mol. Ther.* **2012**, *20* (3), 525-533.
67. Chu, B. C.; Orgel, L. E., Ligation of oligonucleotides to nucleic acids or proteins via disulfide bonds. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16* (9), 3671-3691.
68. Rajur, S. B.; Roth, C. M.; Morgan, J. R.; Yarmush, M. L., Covalent Protein-Oligonucleotide Conjugates for Efficient Delivery of Antisense Molecules. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8* (6), 935-940.
69. Singh, Y.; Spinelli, N.; Defrancq, E.; Dumy, P., A novel heterobifunctional linker for facile access to bioconjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (7), 1413-1419.
70. Thomas, M.; Kularatne, S. A.; Qi, L.; Kleindl, P.; Leamon, C. P.; Hansen, M. J.; Low, P. S., Ligand-targeted delivery of small interfering RNAs to malignant cells and tissues. *Ann. NY Acad. Sci.* **2009**, *1175*, 32-39.
71. Parker, N.; Turk, M. J.; Westrick, E.; Lewis, J. D.; Low, P. S.; Leamon, C. P., Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal. Biochem.* **2005**, *338* (2), 284-293.

72. Low, P. S.; Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D., Discovery and Development of Folic-Acid-Based Receptor Targeting for Imaging and Therapy of Cancer and Inflammatory Diseases. *Accounts Chem. Res.* **2008**, *41* (1), 120-129.
73. Sengle, G.; Jenne, A.; Arora, P. S.; Seelig, B.; Nowick, J. S.; Jäschke, A.; Famulok, M., Synthesis, incorporation efficiency, and stability of disulfide bridged functional groups at RNA 5'-ends. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (6), 1317-1329.
74. Alemdaroglu, F. E.; Herrmann, A., DNA meets synthetic polymers-highly versatile hybrid materials. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (9), 1311-1320.
75. Jung, S.; Lee, S. H.; Mok, H.; Chung, H. J.; Park, T. G., Gene silencing efficiency of siRNA-PEG conjugates: effect of PEGylation site and PEG molecular weight. *J. Control. Release* **2010**, *144* (3), 306-313.
76. (a) Choi, S. W.; Lee, S. H.; Mok, H.; Park, T. G., Multifunctional siRNA delivery system: polyelectrolyte complex micelles of six-arm PEG conjugate of siRNA and cell penetrating peptide with crosslinked fusogenic peptide. *Biotechnol. Prog.* **2010**, *26* (1), 57-63; (b) Oishi, M.; Hayama, T.; Akiyama, Y.; Takae, S.; Harada, A.; Yamasaki, Y.; Nagatsugi, F.; Sasaki, S.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K., Supramolecular Assemblies for the Cytoplasmic Delivery of Antisense Oligodeoxynucleotide: Polyion Complex (PIC) Micelles Based on Poly(ethylene glycol)-SS-Oligodeoxynucleotide Conjugate. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (5), 2449-2454.
77. Lee, S. Y.; Huh, M. S.; Lee, S.; Lee, S. J.; Chung, H.; Park, J. H.; Oh, Y. K.; Choi, K.; Kim, K.; Kwon, I. C., Stability and cellular uptake of polymerized siRNA (poly-siRNA)/polyethylenimine (PEI) complexes for efficient gene silencing. *J. Control. Release* **2010**, *141* (3), 339-346.
78. Vicente, M.; Daniel, P.; Enrique, P.; Anna, G., Linking the 3' Ends of Oligonucleotide Duplexes with Cystine Disulfide Bridges. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006* (4), 958-963.
79. Juliano, R. L., Intracellular Delivery of Oligonucleotide Conjugates and Dendrimer Complexes. *Ann. NY Acad. Sci.* **2006**, *1082* (1), 18-26.
80. Hamilton, S. K.; Sims, A. L.; Donovan, J.; Harth, E., Non-viral siRNA delivery vectors: dendritic molecular transporter and molecular transporter nanovectors for target gene silencing. *Polymer Chem.* **2011**, *2* (2), 441-446.
81. (a) Hamilton, S. K.; Ikizler, M. R.; Wallen, C.; Wright, P. F.; Harth, E., Effective delivery of IgG-antibodies into infected cells via dendritic molecular transporter conjugate IgGMT. *Mol. Biosyst.* **2008**, *4* (12), 1209-1211; (b) Bonduelle, C. V.; Gillies, E. R., Dendritic Guanidines as Efficient Analogues of Cell Penetrating Peptides. *Pharmaceuticals* **2010**, *3* (3), 636-666.
82. (a) Derfus, A. M.; Chen, A. A.; Min, D.-H.; Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N., Targeted Quantum Dot Conjugates for siRNA Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18* (5), 1391-1396; (b) Medintz, I. L.; Berti, L.; Pons, T.; Grimes, A. F.; English, D. S.; Alessandrini, A.; Facci, P.; Mattoussi, H., A Reactive Peptidic Linker for Self-Assembling Hybrid Quantum Dot-DNA Bioconjugates. *Nano. Lett.* **2007**, *7* (6), 1741-1748; (c) Dougan, J. A.; Karlsson, C.; Smith, W. E.; Graham, D., Enhanced oligonucleotide-nanoparticle conjugate stability using thioctic acid modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (11), 3668-3675.
83. Hyeon, L. S.; Hyejung, M.; Gwan, P. T., Di- and Triblock siRNA-PEG Copolymers: PEG Density Effect of Polyelectrolyte Complexes on Cellular Uptake and Gene Silencing Efficiency. *Macromol. Biosci.* **2011**, *11* (3), 410-418.

Bibliographie

84. Semenyuk, A.; Földesi, A.; Johansson, T.; Estmer-Nilsson, C.; Blomgren, P.; Brännvall, M.; Kirsebom, L. A.; Kwiatkowski, M., Synthesis of RNA Using 2'-O-DTM Protection. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (38), 12356-12357.
85. Dirin, M.; Urban, E.; Noe, C. R.; Winkler, J., Fragment-based solid-phase assembly of oligonucleotide conjugates with peptide and polyethylene glycol ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 132-142.
86. Ochi, Y.; Nakagawa, O.; Sakaguchi, K.; Wada, S.-i.; Urata, H., A post-synthetic approach for the synthesis of 2'-O-methyldithiomethyl-modified oligonucleotides responsive to a reducing environment. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (69), 7620-7622.
87. Biscans, A. Synthèse et évaluation d'oligoribonucléotides 2'-O-modifiés par des groupements biolabiles acétalesters ou alkylidithiométhyles dans une approche de prodrogues d'ARN interférents. Université de Montpellier, Thesis, December 2015.
88. Biscans, A.; Rouanet, S.; Vasseur, J.-J.; Dupouy, C.; Debart, F., A versatile post-synthetic method on a solid support for the synthesis of RNA containing reduction-responsive modifications. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (29), 7010-7017.
89. Napoli, C.; Lemieux, C.; Jorgensen, R., Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant. Cell.* **1990**, *2* (4), 279-289.
90. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391* (6669), 806-811.
91. Zamore, P. D.; Tuschl, T.; Sharp, P. A.; Bartel, D. P., RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **2000**, *101* (1), 25-33.
92. Elbashir, S. M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T., RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **2001**, *15* (2), 188-200.
93. Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **2001**, *411* (6836), 494-498.
94. Novina, C. D.; Sharp, P. A., The RNAi revolution. *Nature* **2004**, *430*, 161-164.
95. (a) Engels, J. W., Gene silencing by chemically modified siRNAs. *New Biotechnol.* **2013**, *30* (3), 302-307; (b) Manoharan, M., RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr Opin Chem Biol* **2004**, *8* (6), 570-579.
96. Bernstein, E.; Caudy, A. A.; Hammond, S. M.; Hannon, G. J., Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **2001**, *409* (6818), 363-366.
97. Rao, M.; Sockanathan, S., Molecular mechanisms of RNAi: implications for development and disease. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* **2005**, *75* (1), 28-42.
98. (a) Schwarz, D. S.; Hutvagner, G.; Du, T.; Xu, Z.; Aronin, N.; Zamore, P. D., Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **2003**, *115* (2), 199-208; (b) Khvorova, A.; Reynolds, A.; Jayasena, S. D., Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **2003**, *115* (2), 209-216.

Bibliographie

99. Matranga, C.; Tomari, Y.; Shin, C.; Bartel, D. P.; Zamore, P. D., Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **2005**, *123* (4), 607-620.
100. (a) Meister, G.; Landthaler, M.; Patkaniowska, A.; Dorsett, Y.; Teng, G.; Tuschl, T., Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* **2004**, *15* (2), 185-197; (b) Liu, J.; Carmell, M. A.; Rivas, F. V.; Marsden, C. G.; Thomson, J. M.; Song, J. J.; Hammond, S. M.; Joshua-Tor, L.; Hannon, G. J., Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **2004**, *305* (5689), 1437-1441.
101. Bartlett, D. W.; Davis, M. E., Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (1), 322-333.
102. Sui, G.; Soohoo, C.; Affar el, B.; Gay, F.; Shi, Y.; Forrester, W. C.; Shi, Y., A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (8), 5515-5520.
103. Song, H.; Yang, P.-C., Construction of shRNA lentiviral vector. *N. Am. J. Med. Sci.* **2010**, *2* (12), 598-601.
104. Chakraborty, C.; Sharma, A. R.; Sharma, G.; Doss, C. G. P.; Lee, S. S., Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2017**, *8*, 132-143.
105. Song, E.; Lee, S. K.; Wang, J.; Ince, N.; Ouyang, N.; Min, J.; Chen, J.; Shankar, P.; Lieberman, J., RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Med.* **2003**, *9* (3), 347-351.
106. Haussecker, D., Current issues of RNAi therapeutics delivery and development. *J. Control. Release* **2014**, *195*, 49-54.
107. Wood, H., FDA approves patisiran to treat hereditary transthyretin amyloidosis. *Nat. Rev. Neurology* **2018**, *14* (10), 570-570.
108. Samakoglu, S.; Lisowski, L.; Budak-Alpdogan, T.; Usachenko, Y.; Acuto, S.; Di Marzo, R.; Maggio, A.; Zhu, P.; Tisdale, J. F.; Rivière, I.; Sadelain, M., A genetic strategy to treat sickle cell anemia by coregulating globin transgene expression and RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *24*, 89-94.
109. Mueller, C.; Tang, Q.; Gruntman, A.; Blomenkamp, K.; Teckman, J.; Song, L.; Zamore, P. D.; Flotte, T. R., Sustained miRNA-mediated knockdown of mutant AAT with simultaneous augmentation of wild-type AAT has minimal effect on global liver miRNA profiles. *Mol. Ther.* **2012**, *20* (3), 590-600.
110. Geisbert, T. W.; Lee, A. C.; Robbins, M.; Geisbert, J. B.; Honko, A. N.; Sood, V.; Johnson, J. C.; de Jong, S.; Tavakoli, I.; Judge, A.; Hensley, L. E.; Maclachlan, I., Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet* **2010**, *375* (9729), 1896-1905.
111. Novina, C. D.; Murray, M. F.; Dykxhoorn, D. M.; Beresford, P. J.; Riess, J.; Lee, S. K.; Collman, R. G.; Lieberman, J.; Shankar, P.; Sharp, P. A., siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat. Med.* **2002**, *8* (7), 681-686.
112. (a) Li, S.-D.; Chono, S.; Huang, L., Efficient Oncogene Silencing and Metastasis Inhibition via Systemic Delivery of siRNA. *Mol. Ther.* **2008**, *16* (5), 942-946; (b) Guo, P.; Coban, O.; Snead, N. M.;

- Trebley, J.; Hoepflich, S.; Guo, S.; Shu, Y., Engineering RNA for Targeted siRNA Delivery and Medical Application. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2010**, *62* (6), 650-666; (c) Wang, Z.; Rao, D. D.; Senzer, N.; Nemunaitis, J., RNA interference and cancer therapy. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (12), 2983-2995.
113. Izquierdo, M., Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **2005**, *12* (3), 217-227.
114. Hong, J.; Qian, Z.; Shen, S.; Min, T.; Tan, C.; Xu, J.; Zhao, Y.; Huang, W., High doses of siRNAs induce eri-1 and adar-1 gene expression and reduce the efficiency of RNA interference in the mouse. *Biochem. J.* **2005**, *390* (Pt 3), 675-679.
115. Meng, Z.; Lu, M., RNA Interference-Induced Innate Immunity, Off-Target Effect, or Immune Adjuvant? *Front. Immuno.* **2017**, *8*, 331.
116. Robbins, M.; Judge, A.; MacLachlan, I., siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* **2009**, *19* (2), 89-102.
117. (a) Jackson, A. L.; Bartz, S. R.; Schelter, J.; Kobayashi, S. V.; Burchard, J.; Mao, M.; Li, B.; Cavet, G.; Linsley, P. S., Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (6), 635-637; (b) Birmingham, A.; Anderson, E. M.; Reynolds, A.; Ilesley-Tyree, D.; Leake, D.; Fedorov, Y.; Baskerville, S.; Maksimova, E.; Robinson, K.; Karpilow, J.; Marshall, W. S.; Khvorova, A., 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat. Methods* **2006**, *3* (3), 199-204.
118. (a) Aagaard, L.; Rossi, J. J., RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2007**, *59* (2-3), 75-86; (b) Behlke, M. A., Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol. Ther.* **2006**, *13* (4), 644-670; (c) Gavrillov, K.; Saltzman, W. M., Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J. Biol. Med.* **2012**, *85* (2), 187-200; (d) Welch, J. J.; Swanekamp, R. J.; King, C.; Dean, D. A.; Nilsson, B. L., Functional Delivery of siRNA by Disulfide-Constrained Cyclic Amphipathic Peptides. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (6), 584-589.
119. (a) Delevey, G. F.; Damha, M. J., Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (8), 937-954; (b) Shukla, S.; Sumaria, C. S.; Pradeepkumar, P. I., Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook. *ChemMedChem* **2010**, *5* (3), 328-349; (c) Sharma, V. K.; Watts, J. K., Oligonucleotide therapeutics: chemistry, delivery and clinical progress. *Future Med. Chem.* **2015**, *7* (16), 2221-2242.
120. Manoharan, M.; Akinc, A.; Pandey, R. K.; Qin, J.; Hadwiger, P.; John, M.; Mills, K.; Charisse, K.; Maier, M. A.; Nechev, L.; Greene, E. M.; Pallan, P. S.; Rozners, E.; Rajeev, K. G.; Egli, M., Unique gene-silencing and structural properties of 2'-fluoro-modified siRNAs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (10), 2284-2288.
121. Prakash, T. P.; Allerson, C. R.; Dande, P.; Vickers, T. A.; Sioufi, N.; Jarres, R.; Baker, B. F.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Bhat, B., Positional Effect of Chemical Modifications on Short Interference RNA Activity in Mammalian Cells. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (13), 4247-4253.
122. Damha, M. J.; Wilds, C. J.; Noronha, A.; Brukner, I.; Borkow, G.; Arion, D.; Parniak, M. A., Hybrids of RNA and Arabinonucleic Acids (ANA and 2'-F-ANA) Are Substrates of Ribonuclease H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (49), 12976-12977.

123. Fortin, M.; D'Anjou, H.; Higgins, M.-È.; Gougeon, J.; Aubé, P.; Moktefi, K.; Mouissi, S.; Séguin, S.; Séguin, R.; Renzi, P. M.; Paquet, L.; Ferrari, N., A multi-target antisense approach against PDE4 and PDE7 reduces smoke-induced lung inflammation in mice. *Resp. Res.* **2009**, *10* (1), 39.
124. (a) Kalota, A.; Karabon, L.; Swider, C. R.; Viazovkina, E.; Elzagheid, M.; Damha, M. J.; Gewirtz, A. M., 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (2'F-ANA) modified oligonucleotides (ON) effect highly efficient, and persistent, gene silencing. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (2), 451-461; (b) Martínez-Montero, S.; Deleavey, G. F.; Martín-Pintado, N.; Fakhoury, J. F.; González, C.; Damha, M. J., Locked 2'-Deoxy-2',4'-Difluororibo Modified Nucleic Acids: Thermal Stability, Structural Studies, and siRNA Activity. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (9), 2016-2023.
125. Selvam, C.; Mutisya, D.; Prakash, S.; Ranganna, K.; Thilagavathi, R., Therapeutic potential of chemically modified siRNA: Recent trends. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2017**, *90* (5), 665-678.
126. (a) Ducho, C., Enzymatically Cleavable siRNA Prodrugs: a New Paradigm for the Intracellular Delivery of RNA-Based Therapeutics. *ChemMedChem* **2015**, *10* (10), 1625-1627; (b) Debart, F.; Dupouy, C.; Vasseur, J.-J., Stimuli-responsive oligonucleotides in prodrug-based approaches for gene silencing. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 436-469.
127. (a) Parey, N.; Baraguey, C.; Vasseur, J.-J.; Debart, F., First Evaluation of Acyloxymethyl or Acylthiomethyl Groups as Biolabile 2'-O-Protections of RNA. *Org. Lett.* **2006**, *8* (17), 3869-3872; (b) Martin, A. R.; Lavergne, T.; Vasseur, J.-J.; Debart, F., Assessment of new 2'-O-acetalester protecting groups for regular RNA synthesis and original 2'-modified proRNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (15), 4046-4049.
128. Lavergne, T.; Bertrand, J. R.; Vasseur, J. J.; Debart, F., A Base-Labile Group for 2'-OH Protection of Ribonucleosides: A Major Challenge for RNA Synthesis. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (30), 9135-9138.
129. (a) Lavergne, T.; Baraguey, C.; Dupouy, C.; Parey, N.; Wuensche, W.; Sczakiel, G.; Vasseur, J. J.; Debart, F., Synthesis and preliminary evaluation of pro-RNA 2'-O-masked with biolabile pivaloyloxymethyl groups in an RNA interference assay. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (14), 5719-5731; (b) Biscans, A.; Bos, M.; Martin, A. R.; Ader, N.; Sczakiel, G.; Vasseur, J. J.; Dupouy, C.; Debart, F., Direct synthesis of partially modified 2'-O-pivaloyloxymethyl RNAs by a base-labile protecting group strategy and their potential for prodrug-based gene-silencing applications. *Chembiochem* **2014**, *15* (18), 2674-2679.
130. Biscans, A.; Bertrand, J.-R.; Dubois, J.; Rüger, J.; Vasseur, J.-J.; Sczakiel, G.; Dupouy, C.; Debart, F., Lipophilic 2'-O-Acetal Ester RNAs: Synthesis, Thermal Duplex Stability, Nuclease Resistance, Cellular Uptake, and siRNA Activity after Spontaneous Naked Delivery. *ChemBioChem* **2016**, *17* (21), 2054-2062.
131. Biscans, A.; Rouanet, S.; Bertrand, J.-R.; Vasseur, J.-J.; Dupouy, C.; Debart, F., Synthesis, binding, nuclease resistance and cellular uptake properties of 2'-O-acetalester-modified oligonucleotides containing cationic groups. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (17), 5360-5368.
132. Ochi, Y.; Imai, M.; Nakagawa, O.; Hayashi, J.; Wada, S.-I.; Urata, H., Gene silencing by 2'-O-methyldithiomethyl-modified siRNA, a prodrug-type siRNA responsive to reducing environment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (3), 845-848.
133. Hayashi, J.; Nishigaki, M.; Ochi, Y.; Wada, S.-i.; Wada, F.; Nakagawa, O.; Obika, S.; Harada-Shiba, M.; Urata, H., Effective gene silencing activity of prodrug-type 2'-O-methyldithiomethyl siRNA compared with non-prodrug-type 2'-O-methyl siRNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 2171-2174.

134. Ramon, A. L.; Bertrand, J. R.; de Martimprey, H.; Bernard, G.; Ponchel, G.; Malvy, C.; Vauthier, C., siRNA associated with immunonanoparticles directed against cd99 antigen improves gene expression inhibition in vivo in Ewing's sarcoma. *J. Mol. Recognit.* **2013**, *26* (7), 318-329.
135. Riggi, N.; Cironi, L.; Provero, P.; Suva, M. L.; Kaloulis, K.; Garcia-Echeverria, C.; Hoffmann, F.; Trumpp, A.; Stamenkovic, I., Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res.* **2005**, *65* (24), 11459-11468.
136. Gauthier, F.; Beltran, F.; Biscans, A.; Debart, F.; Dupouy, C.; Vasseur, J.-J., A 2',2'-disulfide-bridged dinucleotide conformationally locks RNA hairpins. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (17), 3181-3188.
137. Zou, Y.; Tiller, P.; Chen, I. W.; Beverly, M.; Hochman, J., Metabolite identification of small interfering RNA duplex by high-resolution accurate mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Sp.* **2008**, *22* (12), 1871-1881.
138. Hong, J.; Huang, Y.; Li, J.; Yi, F.; Zheng, J.; Huang, H.; Wei, N.; Shan, Y.; An, M.; Zhang, H.; Ji, J.; Zhang, P.; Xi, Z.; Du, Q.; Liang, Z., Comprehensive analysis of sequence-specific stability of siRNA. *FASEB J.* **2010**, *24* (12), 4844-4855.
139. Martinez-Ramirez, A.; Rodriguez-Perales, S.; Melendez, B.; Martinez-Delgado, B.; Urioste, M.; Cigudosa, J. C.; Benitez, J., Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet. Cytogen.* **2003**, *141* (2), 138-142.
140. Barbaro, G.; Di Lorenzo, G.; Soldini, M.; Parrotto, S.; Bellomo, G.; Belloni, G.; Grisorio, B.; Barbarini, G., Hepatic glutathione deficiency in chronic hepatitis C: quantitative evaluation in patients who are HIV positive and HIV negative and correlations with plasmatic and lymphocytic concentrations and with the activity of the liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* **1996**, *91* (12), 2569-2573.
141. Pompon, A.; Lefebvre, I.; Imbach, J.-L., "On-line internal surface reversed-phase cleaning": The direct HPLC analysis of crude biological samples Application to the kinetics of degradation of oligonucleotides in cell culture medium. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43* (8), 1769-1775.
142. Dalby, B.; Cates, S.; Harris, A.; Ohki, E. C.; Tilkins, M. L.; Price, P. J.; Ciccarone, V. C., Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **2004**, *33* (2), 95-103.
143. Gauthier, F.; Claveau, S.; Bertrand, J.-R.; Vasseur, J.-J.; Dupouy, C.; Debart, F., Gymnotic delivery and gene silencing activity of reduction-responsive siRNAs bearing lipophilic disulfide-containing modifications at 2'-position. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (16), 4635-4643.
144. Lee, S. H.; Lee, J. Y.; Kim, J. S.; Park, T. G.; Mok, H., Amphiphilic siRNA Conjugates for Co-Delivery of Nucleic Acids and Hydrophobic Drugs. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (8), 2051-2061.
145. Saraswathy, M.; Gong, S., Recent developments in the co-delivery of siRNA and small molecule anticancer drugs for cancer treatment. *Mater. Today.* **2014**, *17* (6), 298-306.
146. Motlagh, N. S. H.; Parvin, P.; Ghasemi, F.; Atyabi, F., Fluorescence properties of several chemotherapy drugs: doxorubicin, paclitaxel and bleomycin. *Biomed. Opt. Express* **2016**, *7* (6), 2400-2406.

147. Cristina, C.; Renato, X. S.; Susana, C.; Sonia, C.; Paulo, J. O.; Maria, S. S.; Paula, I. M., Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16* (25), 3267-3285.
148. Turner, A.; Li, L.-C.; Pilli, T.; Qian, L.; Wiley, E. L.; Setty, S.; Christov, K.; Ganesh, L.; Maker, A. V.; Li, P.; Kanteti, P.; Das Gupta, T. K.; Prabhakar, B. S., MADD Knock-Down Enhances Doxorubicin and TRAIL Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells. *PLOS ONE* **2013**, *8* (2), e56817.
149. Rubio, A. R.; Busto, N.; Leal, J. M.; Garcia, B., Doxorubicin binds to duplex RNA with higher affinity than ctDNA and favours the isothermal denaturation of triplex RNA. *RSC Advances* **2016**, *6* (103), 101142-101152.
150. Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H.-A., Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *66*, 144-150.
151. Stuart, C. H.; Horita, D. A.; Thomas, M. J.; Salsbury, F. R.; Lively, M. O.; Gmeiner, W. H., Site-Specific DNA–Doxorubicin Conjugates Display Enhanced Cytotoxicity to Breast Cancer Cells. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25* (2), 406-413.
152. Yang, F.; Teves, S. S.; Kemp, C. J.; Henikoff, S., Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1845* (1), 84-89.
153. Cutts, S. M.; Nudelman, A.; Rephaeli, A.; Phillips, D. R., The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life* **2005**, *57* (2), 73-81.
154. Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L., Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56* (2), 185-229.
155. (a) Mai, Y.; Yu, J. J.; Bartholdy, B.; Xu-Monette, Z. Y.; Knapp, E. E.; Yuan, F.; Chen, H.; Ding, B. B.; Yao, Z.; Das, B.; Zou, Y.; Young, K. H.; Parekh, S.; Ye, B. H., An oxidative stress-based mechanism of doxorubicin cytotoxicity suggests new therapeutic strategies in ABC-DLBCL. *Blood* **2016**, *128* (24), 2797-2807; (b) Berthiaume, J. M.; Wallace, K. B., Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell. Biol. Toxicol.* **2007**, *23* (1), 15-25.
156. Agudelo, D.; Bourassa, P.; Beaugard, M.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H.-A., tRNA Binding to Antitumor Drug Doxorubicin and Its Analogue. *PLOS ONE* **2013**, *8* (7), e69248.
157. Yousefpour, P.; Atyabi, F.; Farahani, E. V.; Sakhtianchi, R.; Dinarvand, R., Polyanionic carbohydrate doxorubicin–dextran nanocomplex as a delivery system for anticancer drugs: in vitro analysis and evaluations. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 1487-1496.
158. (a) Burkhart, D. J.; Barthel, B. L.; Post, G. C.; Kalet, B. T.; Nafie, J. W.; Shoemaker, R. K.; Koch, T. H., Design, Synthesis, and Preliminary Evaluation of Doxazolidine Carbamates as Prodrugs Activated by Carboxylesterases. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (24), 7002-7012; (b) Houba, P. H. J.; Boven, E.; Meulen-Muileman, I. H. v. d.; Leenders, R. G. G.; Scheeren, J. W.; Pinedo, H. M.; Haisma, H. J., A novel doxorubicin-glucuronide prodrug DOX-GA3 for tumour-selective chemotherapy: distribution and efficacy in experimental human ovarian cancer. *Brit. J. Cancer* **2001**, *84* (4), 550-557; (c) Boven, E.; Hendriks, H. R.; Erkelens, C. A.; Pinedo, H. M., The anti-tumour effects of the prodrugs N-l-leucyl-doxorubicin and vinblastine-isoleucinate in human ovarian cancer xenografts. *Brit. J. Cancer* **1992**, *66* (6), 1044-1047.

159. Hay, M. P.; Wilson, W. R.; Denny, W. A., Nitroarylmethylcarbamate prodrugs of doxorubicin for use with nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (12), 4043-4055.
160. MacKay, J. A.; Chen, M.; McDaniel, J. R.; Liu, W.; Simnick, A. J.; Chilkoti, A., Self-assembling chimeric polypeptide-doxorubicin conjugate nanoparticles that abolish tumors after a single injection. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (12), 993-999.
161. Latorre, A.; Couleaud, P.; Aires, A.; Cortajarena, A. L.; Somoza, Á., Multifunctionalization of magnetic nanoparticles for controlled drug release: A general approach. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *82*, 355-362.
162. Yu, Y. H.; Kim, E.; Park, D. E.; Shim, G.; Lee, S.; Kim, Y. B.; Kim, C.-W.; Oh, Y.-K., Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80* (2), 268-273.
163. (a) Xia, T.; Kovochich, M.; Liong, M.; Meng, H.; Kabehie, S.; George, S.; Zink, J. I.; Nel, A. E., Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs. *ACS Nano*. **2009**, *3* (10), 3273-3286; (b) Chen, A. M.; Zhang, M.; Wei, D.; Stueber, D.; Taratula, O.; Minko, T.; He, H., Co-delivery of Doxorubicin and Bcl-2 siRNA by Mesoporous Silica Nanoparticles Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Multidrug Resistant Cancer Cells. *Small* **2009**, *5* (23), 2673-2677.
164. (a) Yang, T.; Li, B.; Qi, S.; Liu, Y.; Gai, Y.; Ye, P.; Yang, G.; Zhang, W.; Zhang, P.; He, X.; Li, W.; Zhang, Z.; Xiang, G.; Xu, C., Co-delivery of Doxorubicin and Bmi1 siRNA by Folate Receptor Targeted Liposomes Exhibits Enhanced Anti-Tumor Effects in vitro and in vivo. *Theranostics* **2014**, *4* (11), 1096-1111; (b) Torchilin, V. P., Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, *4*, 145-160.
165. (a) Weicai, C.; Yuanyuan, Y.; Du, C.; Jifeng, C.; Lu, W.; Xintao, S., Co-Delivery of Doxorubicin and siRNA with Reduction and pH Dually Sensitive Nanocarrier for Synergistic Cancer Therapy. *Small* **2014**, *10* (13), 2678-2687; (b) Dong, D.-W.; Xiang, B.; Gao, W.; Yang, Z.-Z.; Li, J.-Q.; Qi, X.-R., pH-responsive complexes using prefunctionalized polymers for synchronous delivery of doxorubicin and siRNA to cancer cells. *Biomaterials* **2013**, *34* (20), 4849-4859.
166. Zhong, Q.; da Rocha, S. R., Poly(amidoamine) Dendrimer-Doxorubicin Conjugates: In Vitro Characteristics and Pseudosolution Formulation in Pressurized Metered-Dose Inhalers. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (3), 1058-1072.
167. Yousef, T.; Hassan, N., Supramolecular encapsulation of doxorubicin with β -cyclodextrin dendrimer: in vitro evaluation of controlled release and cytotoxicity. *J. Inclusion Phenom. Macro.* **2017**, *87* (1), 105-115.
168. Duncan, R., Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (9), 688-701.
169. (a) Zhao, J.; Feng, S.-S., Nanocarriers for delivery of siRNA and co-delivery of siRNA and other therapeutic agents. *Nanomedicine* **2015**, *10* (14), 2199-2228; (b) Xiao, B.; Ma, L.; Merlin, D., Nanoparticle-mediated co-delivery of chemotherapeutic agent and siRNA for combination cancer therapy. *Expert Opin. Drug. Del.* **2017**, *14* (1), 65-73; (c) Sun, H.; Yarovoy, I.; Capeling, M.; Cheng, C., Polymers in the Co-delivery of siRNA and Anticancer Drugs for the Treatment of Drug-resistant Cancers. *Top. Curr. Chem.* **2017**, *375* (2), 24.

170. (a) Hoon Jeong, J.; Christensen, L. V.; Yockman, J. W.; Zhong, Z.; Engbersen, J. F. J.; Jong Kim, W.; Feijen, J.; Wan Kim, S., Reducible poly(amido ethylenimine) directed to enhance RNA interference. *Biomaterials* **2007**, *28* (10), 1912-1917; (b) Breunig, M.; Hozsa, C.; Lungwitz, U.; Watanabe, K.; Umeda, I.; Kato, H.; Goepferich, A., Mechanistic investigation of poly(ethylene imine)-based siRNA delivery: Disulfide bonds boost intracellular release of the cargo. *J. Controlled Release* **2008**, *130* (1), 57-63.
171. (a) Butt, A. M.; Amin, M. C. I. M.; Katas, H.; Abdul Murad, N. A.; Jamal, R.; Kesharwani, P., Doxorubicin and siRNA Codelivery via Chitosan-Coated pH-Responsive Mixed Micellar Polyplexes for Enhanced Cancer Therapy in Multidrug-Resistant Tumors. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (12), 4179-4190; (b) Alinejad, V.; Hossein Somi, M.; Baradaran, B.; Akbarzadeh, P.; Atyabi, F.; Kazerooni, H.; Samadi Kafil, H.; Aghebati Maleki, L.; Siah Mansouri, H.; Yousefi, M., Co-delivery of IL17RB siRNA and doxorubicin by chitosan-based nanoparticles for enhanced anticancer efficacy in breast cancer cells. *Biomed Pharmacother* **2016**, *83*, 229-240.
172. Xia, Y.; Xu, T.; Wang, C.; Li, Y.; Lin, Z.; Zhao, M.; Zhu, B., Novel functionalized nanoparticles for tumor-targeting co-delivery of doxorubicin and siRNA to enhance cancer therapy. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 143-159.
173. Roth, M. E.; Green, O.; Gnam, S.; Shabat, D., Dendritic, Oligomeric, and Polymeric Self-Immolative Molecular Amplification. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (3), 1309-1352.
174. Satyam, A., Design and synthesis of releasable folate-drug conjugates using a novel heterobifunctional disulfide-containing linker. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (11), 3196-3199.
175. Kratz, F.; Muller, I. A.; Ryppa, C.; Warnecke, A., Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *ChemMedChem* **2008**, *3* (1), 20-53.
176. Carl, P. L.; Chakravarty, P. K.; Katzenellenbogen, J. A., A novel connector linkage applicable in prodrug design. *J. Med. Chem.* **1981**, *24* (5), 479-480.
177. Vlahov, I. R.; Wang, Y.; Kleindl, P. J.; Leamon, C. P., Design and regioselective synthesis of a new generation of targeted chemotherapeutics. Part II: Folic acid conjugates of tubulysins and their hydrazides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (16), 4558-4561.
178. Alouane, A.; Labruère, R.; Saux, T. L.; Schmidt, F.; Jullien, L., Self-Immolative Spacers: Kinetic Aspects, Structure–Property Relationships, and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (26), 7492-7509.
179. (a) Zhang, X.-b.; Waibel, M.; Hasserodt, J., An Autoimmolative Spacer Allows First-Time Incorporation of a Unique Solid-State Fluorophore into a Detection Probe for Acyl Hydrolases. *Chem. – Eur. J.* **2010**, *16* (3), 792-795; (b) Gnam, S.; Shabat, D., Self-Immolative Chemiluminescence Polymers: Innate Assimilation of Chemiexcitation in a Domino-like Depolymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (29), 10002-10008; (c) Meyer, Y.; Richard, J. A.; Delest, B.; Noack, P.; Renard, P. Y.; Romieu, A., A comparative study of the self-immolation of para-aminobenzylalcohol and hemithioaminal-based linkers in the context of protease-sensitive fluorogenic probes. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (8), 1777-1780.
180. Jourden, J. L. M.; Daniel, K. B.; Cohen, S. M., Investigation of self-immolative linkers in the design of hydrogen peroxide activated metalloprotein inhibitors. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (28), 7968-7970.

181. (a) DeWit, M. A.; Gillies, E. R., A Cascade Biodegradable Polymer Based on Alternating Cyclization and Elimination Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (51), 18327-18334; (b) Warnecke, A.; Kratz, F., 2,4-Bis(hydroxymethyl)aniline as a Building Block for Oligomers with Self-Eliminating and Multiple Release Properties. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (4), 1546-1552.
182. (a) Ibsen, S.; Zahavy, E.; Wrasdilo, W.; Berns, M.; Chan, M.; Esener, S., A Novel Doxorubicin Prodrug with Controllable Photolysis Activation for Cancer Chemotherapy. *Pharm. Res.* **2010**, *27* (9), 1848-1860; (b) Kevwitch, R. M.; Shanahan, C. S.; McGrath, D. V., Vanillin and o-vanillin oligomers as models for dendrimer disassembly. *New J. Chem.* **2012**, *36* (2), 492-505.
183. (a) Shamis, M.; Shabat, D., Single-Triggered AB₆ Self-Immolative Dendritic Amplifiers. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13* (16), 4523-4528; (b) Waibel, M.; Zhang, X.-B.; Hasserodt, J., Aspects of the Synthesis of an Exceptionally Preorganized Self-Immolative Spacer-Phenolate Unit. *Synthesis* **2009**, *2009*, 318-324.
184. (a) Erez, R.; Shabat, D., The azaquinone-methide elimination: comparison study of 1,6- and 1,4-eliminations under physiological conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (15), 2669-2672; (b) Grinda, M.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Papot, S., A self-immolative dendritic glucuronide prodrug of doxorubicin. *MedChemComm* **2012**, *3* (1), 68-70; (c) Yan, J.; Lee, S.; Zhang, A.; Yoon, J., Self-immolative colorimetric, fluorescent and chemiluminescent chemosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (18), 6900-6916; (d) Ho, N.-H.; Weissleder, R.; Tung, C.-H., A Self-Immolative Reporter For β -Galactosidase Sensing. *ChemBioChem* **2007**, *8* (5), 560-566.
185. (a) Blencowe, C. A.; Russell, A. T.; Greco, F.; Hayes, W.; Thornthwaite, D. W., Self-immolative linkers in polymeric delivery systems. *Polymer Chem.* **2011**, *2* (4), 773-790; (b) Sagi, A.; Weinstain, R.; Karton, N.; Shabat, D., Self-Immolative Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (16), 5434-5435; (c) A., D. M.; Annelise, B.; R., G. E., A reduction sensitive cascade biodegradable linear polymer. *J. Polym. Sci. A1* **2010**, *48* (18), 3977-3985.
186. McBride, R. A., Degradation Kinetics and Functional Design of Linear Self-Immolative Polymers. The University of Western Ontario, 2013.
187. Peterson, G. I.; Larsen, M. B.; Boydston, A. J., Controlled Depolymerization: Stimuli-Responsive Self-Immolative Polymers. *Macromolecules* **2012**, *45* (18), 7317-7328.
188. Srinivasarao, M.; Low, P. S., Ligand-Targeted Drug Delivery. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (19), 12133-12164.
189. Wong, A. D.; DeWit, M. A.; Gillies, E. R., Amplified release through the stimulus triggered degradation of self-immolative oligomers, dendrimers, and linear polymers. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2012**, *64* (11), 1031-1045.
190. de Groot, F. M. H.; Loos, W. J.; Koekkoek, R.; van Berkom, L. W. A.; Busscher, G. F.; Seelen, A. E.; Albrecht, C.; de Bruijn, P.; Scheeren, H. W., Elongated Multiple Electronic Cascade and Cyclization Spacer Systems in Activatable Anticancer Prodrugs for Enhanced Drug Release. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (26), 8815-8830.
191. Jain, N.; Smith, S. W.; Ghone, S.; Tomczuk, B., Current ADC Linker Chemistry. *Pharm. Res.* **2015**, *32* (11), 3526-3540.
192. Pillow, T. H.; Sadowsky, J. D.; Zhang, D.; Yu, S.-F.; Del Rosario, G.; Xu, K.; He, J.; Bhakta, S.; Ohri, R.; Kozak, K. R.; Ha, E.; Junutula, J. R.; Flygare, J. A., Decoupling stability and release in disulfide bonds

with antibody-small molecule conjugates †Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6sc01831a Click here for additional data file. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (1), 366-370.

193. Gomes, P.; Vale, N.; Moreira, R., Cyclization-activated Prodrugs. *Molecules* **2007**, *12* (11), 2484.
194. DeWit, M. A.; Gillies, E. R., Design, synthesis, and cyclization of 4-aminobutyric acid derivatives: potential candidates as self-immolative spacers. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (6), 1846-1854.
195. Johnson, C. D.; Lane, S.; Edwards, P. N.; Taylor, P. J., Prodrugs based on masked lactones. Cyclization of γ -hydroxy amides. *J. Org. Chem.* **1988**, *53* (21), 5130-5139.
196. (a) Amsberry, K. L.; Gerstenberger, A. E.; Borchardt, R. T., Amine Prodrugs Which Utilize Hydroxy Amide Lactonization. II. A Potential Esterase-Sensitive Amide Prodrug. *Pharm. Res.* **1991**, *8* (4), 455-461; (b) Shan, D.; Nicolaou, M. G.; Borchardt, R. T.; Wang, B., Prodrug Strategies Based on Intramolecular Cyclization Reactions. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86* (7), 765-767.
197. (a) Vlahov, I. R.; Vite, G. D.; Kleindl, P. J.; Wang, Y.; Santhapuram, H. K. R.; You, F.; Howard, S. J.; Kim, S.-H.; Lee, F. F. Y.; Leamon, C. P., Regioselective synthesis of folate receptor-targeted agents derived from epothilone analogs and folic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (15), 4578-4581; (b) El Alaoui, A.; Schmidt, F.; Amessou, M.; Sarr, M.; Decaudin, D.; Florent, J.-C.; Johannes, L., Shiga Toxin-Mediated Retrograde Delivery of a Topoisomerase I Inhibitor Prodrug. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (34), 6469-6472; (c) Senter, P. D.; Pearce, W. E.; Greenfield, R. S., Development of a drug-release strategy based on the reductive fragmentation of benzyl carbamate disulfides. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (9), 2975-2978; (d) Batisse, C.; Dransart, E.; Ait Sarkouh, R.; Brulle, L.; Bai, S.-K.; Godefroy, S.; Johannes, L.; Schmidt, F., A new delivery system for auristatin in STxB-drug conjugate therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 483-491; (e) Chen, S.; Zhao, X.; Chen, J.; Chen, J.; Kuznetsova, L.; Wong, S. S.; Ojima, I., Mechanism-Based Tumor-Targeting Drug Delivery System. Validation of Efficient Vitamin Receptor-Mediated Endocytosis and Drug Release. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (5), 979-987.
198. Jain, A. K.; Gund, M. G.; Desai, D. C.; Borhade, N.; Senthilkumar, S. P.; Dhiman, M.; Mangu, N. K.; Mali, S. V.; Dubash, N. P.; Halder, S.; Satyam, A., Mutual prodrugs containing bio-cleavable and drug releasable disulfide linkers. *Bioorg. Chem.* **2013**, *49*, 40-48.
199. Jones, L. R.; Goun, E. A.; Shinde, R.; Rothbard, J. B.; Contag, C. H.; Wender, P. A., Releasable Luciferin-Transporter Conjugates: Tools for the Real-Time Analysis of Cellular Uptake and Release. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (20), 6526-6527.
200. (a) Lapeyre, M.; Leprince, J.; Massonneau, M.; Oulyadi, H.; Renard, P.-Y.; Romieu, A.; Turcatti, G.; Vaudry, H., Aryldithioethyloxycarbonyl (Ardec): A New Family of Amine Protecting Groups Removable under Mild Reducing Conditions and Their Applications to Peptide Synthesis. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12* (13), 3655-3671; (b) Frich, R. C.; Anton, S.; Alexander, Z., Self-Immolative Linkers Literally Bridge Disulfide Chemistry and the Realm of Thiol-Free Drugs. *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4* (12), 1887-1890.
201. Gund, M.; Khanna, A.; Dubash, N.; Damre, A.; Singh, K. S.; Satyam, A., Water-soluble prodrugs of paclitaxel containing self-immolative disulfide linkers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (1), 122-127.
202. A., L. C.; Somoza Calatrava, Á.; Couleaud, P.; Ocampo Garcia, S.; Aires Trapote, A.; Latorre Lozano, A. WO2016150521 Functionalised magnetic nanoparticles. 2016.

203. Piorecka, K.; Stanczyk, W.; Florczak, M., NMR analysis of antitumor drugs: Doxorubicin, daunorubicin and their functionalized derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58* (2), 152-155.
204. Metelev, V.; Romanenkov, A.; Kubareva, E.; Zubin, E.; Polouchine, N.; Zatsepin, T.; Molochkov, N.; Oretskaya, T., Structure-based cross-linking of NF-kappa B p50 homodimer and decoy bearing a novel 2'-disulfide trapping site. *IUBMB Life* **2006**, *58* (11), 654-658.
205. (a) Xu, R.; Fisher, M.; Juliano, R. L., Targeted albumin-based nanoparticles for delivery of amphipathic drugs. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (5), 870-878; (b) Tian, Y.; Bromberg, L.; Lin, S. N.; Hatton, T. A.; Tam, K. C., Complexation and release of doxorubicin from its complexes with pluronic P85-b-poly(acrylic acid) block copolymers. *J. Control. Release* **2007**, *121* (3), 137-145; (c) Yabbarov, N. G.; Posypanova, G. A.; Vorontsov, E. A.; Popova, O. N.; Severin, E. S., Targeted delivery of doxorubicin: Drug delivery system based on PAMAM dendrimers. *Biochemistry (Moscow)* **2013**, *78* (8), 884-894.
206. Kaushik, D.; Bansal, G., Four new degradation products of doxorubicin: An application of forced degradation study and hyphenated chromatographic techniques. *J. Pharm. Anal.* **2015**, *5* (5), 285-295.
207. (a) Nina, G. D.; Eugeny, M. Z.; Elena, A. K.; Timofey, S. Z.; Tatiana, S. O., Design and Synthesis of 2-Functionalised Oligonucleotides. Their Application for Covalent Trapping the Protein – DNA Complexes. *Curr Org Chem* **2009**, *13* (11), 1029-1049; (b) Lönnberg, H., Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotide Conjugates Useful for Delivery and Targeting of Potential Nucleic Acid Therapeutics. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (6), 1065-1094; (c) Jeong, J. H.; Mok, H.; Oh, Y.-K.; Park, T. G., siRNA Conjugate Delivery Systems. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20* (1), 5-14; (d) Juliano, R. L., The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (14), 6518-6548.
208. Ming, X.; Laing, B., Bioconjugates for targeted delivery of therapeutic oligonucleotides. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* **2015**, *87*, 81-89.
209. Spicer, C. D.; Pashuck, E. T.; Stevens, M. M., Achieving Controlled Biomolecule-Biomaterial Conjugation. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (16), 7702-7743.
210. Lu, K.; Duan, Q.-P.; Ma, L.; Zhao, D.-X., Chemical Strategies for the Synthesis of Peptide–Oligonucleotide Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (2), 187-202.
211. (a) Zatsepin, T. S.; Oretskaya, T. S., Synthesis and applications of oligonucleotide-carbohydrate conjugates. *Chem. Biodivers.* **2004**, *1* (10), 1401-1417; (b) Aviñó, A.; Ocampo, S. M.; Lucas, R.; Reina, J. J.; Morales, J. C.; Perales, J. C.; Eritja, R., Synthesis and in vitro inhibition properties of siRNA conjugates carrying glucose and galactose with different presentations. *Mol. Divers.* **2011**, *15* (3), 751-757.
212. Ikeda, Y.; Kubota, D.; Nagasaki, Y., Simple Solid-Phase Synthesis and Biological Properties of Carbohydrate–Oligonucleotide Conjugates Modified at the 3'-Terminus. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (9), 1685-1690.
213. Sato, A.; Takagi, M.; Shimamoto, A.; Kawakami, S.; Hashida, M., Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice. *Biomaterials* **2007**, *28* (7), 1434-1442.
214. Sonoke, S.; Ueda, T.; Fujiwara, K.; Kuwabara, K.; Yano, J., Galactose-modified cationic liposomes as a liver-targeting delivery system for small interfering RNA. *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, *34* (8), 1338-1342.

215. (a) Akinc, A.; Querbes, W.; De, S.; Qin, J.; Frank-Kamenetsky, M.; Jayaprakash, K. N.; Jayaraman, M.; Rajeev, K. G.; Cantley, W. L.; Dorkin, J. R.; Butler, J. S.; Qin, L.; Racie, T.; Sprague, A.; Fava, E.; Zeigerer, A.; Hope, M. J.; Zerial, M.; Sah, D. W.; Fitzgerald, K.; Tracy, M. A.; Manoharan, M.; Koteliensky, V.; Fougères, A.; Maier, M. A., Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol. Ther.* **2010**, *18* (7), 1357-1364; (b) Wooddell, C. I.; Rozema, D. B.; Hossbach, M.; John, M.; Hamilton, H. L.; Chu, Q.; Hegge, J. O.; Klein, J. J.; Wakefield, D. H.; Oropeza, C. E.; Deckert, J.; Roehl, I.; Jahn-Hofmann, K.; Hadwiger, P.; Vornlocher, H.-P.; McLachlan, A.; Lewis, D. L., Hepatocyte-targeted RNAi Therapeutics for the Treatment of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Mol. Ther.* **2013**, *21* (5), 973-985; (c) Prakash, T. P.; Graham, M. J.; Yu, J.; Carty, R.; Low, A.; Chappell, A.; Schmidt, K.; Zhao, C.; Aghajan, M.; Murray, H. F.; Riney, S.; Booten, S. L.; Murray, S. F.; Gaus, H.; Crosby, J.; Lima, W. F.; Guo, S.; Monia, B. P.; Swayze, E. E.; Seth, P. P., Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (13), 8796-8807; (d) Matsuda, S.; Keiser, K.; Nair, J. K.; Charisse, K.; Manoharan, R. M.; Kretschmer, P.; Peng, C. G.; V. Kel'in, A.; Kandasamy, P.; Willoughby, J. L. S.; Liebow, A.; Querbes, W.; Yucius, K.; Nguyen, T.; Milstein, S.; Maier, M. A.; Rajeev, K. G.; Manoharan, M., siRNA Conjugates Carrying Sequentially Assembled Trivalent N-Acetylgalactosamine Linked Through Nucleosides Elicit Robust Gene Silencing In Vivo in Hepatocytes. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (5), 1181-1187.
216. Ugarte-Urbe, B.; Pérez-Rentero, S.; Lucas, R.; Aviñó, A.; Reina, J. J.; Alkorta, I.; Eritja, R.; Morales, J. C., Synthesis, Cell-Surface Binding, and Cellular Uptake of Fluorescently Labeled Glucose–DNA Conjugates with Different Carbohydrate Presentation. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (7), 1280-1287.
217. Venturelli, L.; Nappini, S.; Bulfoni, M.; Gianfranceschi, G.; Dal Zilio, S.; Coceano, G.; Del Ben, F.; Turetta, M.; Scoles, G.; Vaccari, L.; Cesselli, D.; Cojoc, D., Glucose is a key driver for GLUT1-mediated nanoparticles internalization in breast cancer cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21629.
218. (a) Mukhopadhyay, S.; Maitra, U., Chemistry and biology of bile acids. *Curr Sci* **2004**, *87* (12), 1666-1683; (b) Noponen, V.; Belt, H.; Lahtinen, M.; Valkonen, A.; Salo, H.; Ulrichová, J.; Galandáková, A.; Sievänen, E., Bile acid–cysteamine conjugates: Structural properties, gelation, and toxicity evaluation. *Steroids* **2012**, *77* (3), 193-203.
219. (a) Wammers, M.; Schupp, A. K.; Bode, J. G.; Ehltling, C.; Wolf, S.; Deenen, R.; Kohrer, K.; Haussinger, D.; Graf, D., Reprogramming of pro-inflammatory human macrophages to an anti-inflammatory phenotype by bile acids. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 255; (b) Katrin, H.; G., B. J.; Marianne, W.; Christian, E.; Verena, K.; Laura, K.; Anna-Kathrin, S.; Dieter, H.; Dirk, G., Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages. *J. Leukocyte Biol.* **2013**, *94* (6), 1253-1264.
220. (a) Bajaj, A.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S., Effect of the Nature of the Spacer on Gene Transfer Efficacies of Novel Thiocholesterol Derived Gemini Lipids in Different Cell Lines: A Structure–Activity Investigation. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (8), 2533-2540; (b) Raouane, M.; Desmaële, D.; Urbinati, G.; Massaad-Massade, L.; Couvreur, P., Lipid Conjugated Oligonucleotides: A Useful Strategy for Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (6), 1091-1104.
221. Danko, M.; Szabo, E.; Hrdlovic, P., Synthesis and spectral characteristics of fluorescent dyes based on coumarin fluorophore and hindered amine stabilizer in solution and polymer matrices. *Dyes Pigments* **2011**, *90* (2), 129-138.
222. Thoren, P. E.; Persson, D.; Esbjorner, E. K.; Goksor, M.; Lincoln, P.; Norden, B., Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides. *Biochemistry* **2004**, *43* (12), 3471-3489.

223. Li, H.; Cai, L.; Li, J.; Hu, Y.; Zhou, P.; Zhang, J., Novel coumarin fluorescent dyes: Synthesis, structural characterization and recognition behavior towards Cu(II) and Ni(II). *Dyes Pigments* **2011**, *91* (3), 309-316.
224. Kim, G.-J.; Kim, H.-J., Doubly activated coumarin as a colorimetric and fluorescent chemodosimeter for cyanide. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (1), 185-187.
225. Du, L.; Ni, N.; Li, M.; Wang, B., A Fluorescent Hydrogen Peroxide Probe Based on a 'Click' Modified Coumarin Fluorophore. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (8), 1152-1154.
226. Hong, S. W.; Jo, W. H., A fluorescence resonance energy transfer probe for sensing pH in aqueous solution. *Polymer* **2008**, *49* (19), 4180-4187.
227. He, L.; Xu, Q.; Liu, Y.; Wei, H.; Tang, Y.; Lin, W., Coumarin-Based Turn-On Fluorescence Probe for Specific Detection of Glutathione over Cysteine and Homocysteine. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2015**, *7* (23), 12809-12813.
228. (a) Ren, W. X.; Han, J.; Uhm, S.; Jang, Y. J.; Kang, C.; Kim, J. H.; Kim, J. S., Recent development of biotin conjugation in biological imaging, sensing, and target delivery. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (52), 10403-10418; (b) Russell-Jones, G.; McTavish, K.; McEwan, J.; Rice, J.; Nowotnik, D., Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98* (10), 1625-1633.
229. Noe, C. R.; Dirin, M.; Winkler, J.; Lachmann, B.; Urban, E., EP2845607A1 Antisense oligonucleotides with improved pharmacokinetic properties. 2015.
230. Dirin, M.; Urban, E.; Lachmann, B.; Noe, C. R.; Winkler, J., Concise postsynthetic preparation of oligonucleotide-oligopeptide conjugates through facile disulfide bond formation. *Future Med. Chem.* **2015**, *7* (13), 1657-1673.
231. Gallo, M.; Montserrat, J. M.; Iribarren, A. M., Design and applications of modified oligonucleotides. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2003**, *36*, 143-151.
232. Mori, K.; Kodama, T.; Baba, T.; Obika, S., Bridged nucleic acid conjugates at 6'-thiol: synthesis, hybridization properties and nuclease resistances. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (14), 5272-5279.
233. Ghosh, A. K.; Brindisi, M., Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (7), 2895-2940.
234. Seio, K.; Tawarada, R.; Sasami, T.; Serizawa, M.; Ise, M.; Ohkubo, A.; Sekine, M., Synthesis and hybridization of 2'-O-methyl-RNAs incorporating 2'-O-carbamoyluridine and unique participation of the carbamoyl group in U-G base pair. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (20), 7275-7280.
235. Misra, A.; Mishra, S.; Misra, K., Synthesis and Fluorescence Studies of Multiple Labeled Oligonucleotides Containing Dansyl Fluorophore Covalently Attached at 2'-Terminus of Cytidine via Carbamate Linkage. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15* (3), 638-646.
236. Seio, K.; Tokugawa, M.; Kanamori, T.; Tsunoda, H.; Ohkubo, A.; Sekine, M., Synthesis and properties of cationic 2'-O-[N-(4-aminobutyl)carbamoyl] modified oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (7), 2470-2473.
237. Huo, X.; Juergens, S.; Zhang, X.; Rezaei, D.; Yu, C.; Strauch, E. D.; Wang, J. Y.; Cheng, E.; Meyer, F.; Wang, D. H.; Zhang, Q.; Spechler, S. J.; Souza, R. F., Deoxycholic acid causes DNA damage while

inducing apoptotic resistance through NF-kappaB activation in benign Barrett's epithelial cells. *Am J Physiol-Gastr L* **2011**, *301* (2), 278-286.

238. Robert, B.; Robert, R.; Jennifer, D., Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38* (16), 2326-2343.

239. Warner, K. D.; Chen, M. C.; Song, W.; Strack, R. L.; Thorn, A.; Jaffrey, S. R.; Ferré-D'Amaré, A. R., Structural basis for activity of highly efficient RNA mimics of green fluorescent protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 658–663.

240. Sun, X.; Li, J. M.; Wartell, R. M., Conversion of stable RNA hairpin to a metastable dimer in frozen solution. *RNA* **2007**, *13* (12), 2277-2286.

241. Svoboda, P.; Cara, A. D., Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cell Mol. Life Sci.* **2006**, *63* (7), 901-908.

242. Toulmé, J. G., R, Les aptamères : des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection in vitro. *Med. Sci. (Paris)* **1998**, *14* (2), 155-166.

243. Sun, H.; Zhu, X.; Lu, P. Y.; Rosato, R. R.; Tan, W.; Zu, Y., Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2014**, *3*, e182.

244. Serganov, A.; Nudler, E., A Decade of Riboswitches. *Cell* **2013**, *152* (0), 17-24.

245. DebRoy, S.; Gebbie, M.; Ramesh, A.; Goodson, J. R.; Cruz, M. R.; van Hoof, A.; Winkler, W. C.; Garsin, D. A., A riboswitch-containing sRNA controls gene expression by sequestration of a response regulator. *Science* **2014**, *345* (6199), 937-940.

246. McManus, M. T.; Petersen, C. P.; Haines, B. B.; Chen, J.; Sharp, P. A., Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* **2002**, *8* (6), 842-850.

247. (a) Trinh, T. L.; Zhu, G.; Xiao, X.; Puszyk, W.; Sefah, K.; Wu, Q.; Tan, W.; Liu, C., A Synthetic Aptamer-Drug Adduct for Targeted Liver Cancer Therapy. *PLOS ONE* **2015**, *10* (11), e0136673; (b) Kim, S. H.; Jeong, J. H.; Lee, S. H.; Kim, S. W.; Park, T. G., PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy. *J. Controlled Release* **2006**, *116* (2), 123-129; (c) McNamara li, J. O.; Andreckek, E. R.; Wang, Y.; Viles, K. D.; Rempel, R. E.; Gilboa, E.; Sullenger, B. A.; Giangrande, P. H., Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1005–1015.

248. Morita, Y.; Leslie, M.; Kameyama, H.; Volk, D.; Tanaka, T., Aptamer Therapeutics in Cancer: Current and Future. *Cancer* **2018**, *10* (3), 80.

249. 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.* **2004**, *351* (27), 2805-2816.

250. Defrancq, E.; Singh, Y.; Spinelli, N., Chemical Strategies for Oligonucleotide-Conjugates Synthesis. *Curr Org Chem* **2008**, *12* (4), 263-290.

251. Shukla, D.; Namperumalsamy, P.; Goldbaum, M.; T Cunningham, E., *Pegaptanib sodium for ocular vascular disease*. 2007; Vol. 55, p 427-430.

252. Kiliszek, A.; Blaszczyk, L.; Kierzek, R.; Rypniewski, W., Stabilization of RNA hairpins using non-nucleotide linkers and circularization. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (10), e92.

Bibliographie

253. Micura, R.; Pils, W.; Höbartner, C.; Grubmayr, K.; Ebert, M.-O.; Jaun, B., Methylation of the nucleobases in RNA oligonucleotides mediates duplex–hairpin conversion. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (19), 3997-4005.
254. Gorodetsky, A. A.; Barton, J. K., DNA-Mediated Electrochemistry of Disulfides on Graphite. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (19), 6074-6075.
255. Alefelder, S.; Sigurdsson, S. T., Interstrand disulfide cross-linking of internal sugar residues in duplex RNA. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (1), 269-273.
256. Prestinari, C.; Richert, C., Intrastrand locks increase duplex stability and base pairing selectivity. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (38), 10824-10826.
257. Fujita, M.; Watanabe, S.; Yoshizawa, M.; Yamamoto, J.; Iwai, S., Analysis of Structural Flexibility of Damaged DNA Using Thiol-Tethered Oligonucleotide Duplexes. *PLOS ONE* **2015**, *10* (2), e0117798.
258. Nina, D.; Valeri, M.; Tatiana, O.; David, T.; Zoe, S., Hairpin-shaped DNA duplexes with disulfide bonds in sugar-phosphate backbone as potential DNA reagents for crosslinking with proteins. *FEBS Lett.* **1999**, *444* (2-3), 285-290.
259. (a) Vorob'eva, O. V.; Romanenkov, A. S.; Metelev, V. G.; Karyagina, A. S.; Lavrova, N. V.; Oretskaya, T. S.; Kubareva, E. A., Crosslinking of Cys142 of Methyltransferase SsoII with DNA Duplexes Containing a Single Internucleotide Phosphoryldisulfide Link. *Mol. Biol.* **2003**, *37* (5), 772-779; (b) Valeri, M.; Elena, K.; Olga, V.; Andrey, R.; Tatiana, O., Specific conjugation of DNA binding proteins to DNA templates through thiol–disulfide exchange. *FEBS Lett.* **2003**, *538* (1-3), 48-52; (c) Romanenkov, A. S.; Ustyugov, A. A.; Zatsepin, T. S.; Nikulova, A. A.; Kolesnikov, I. V.; Metelev, V. G.; Oretskaya, T. S.; Kubareva, E. A., Analysis of DNA-Protein Interactions in Complexes of Transcription Factor NF- κ B with DNA. *Biochemistry (Moscow)* **2005**, *70* (11), 1212-1222.
260. (a) Glick, G. D., Synthesis of a conformationally restricted DNA hairpin. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (24), 6746-6747; (b) Wang, H.; Osborne, S. E.; Zuiderweg, E. R. P.; Glick, G. D., Three-Dimensional Structure of a Disulfide-Stabilized Non-Ground-State DNA Hairpin. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (11), 5021-5022; (c) Swanson, P. C.; Glick, G. D., Chemical Sequencing of Disulfide Cross-linked oligodeoxyribonucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3* (10), 2117-2118; (d) Cain, R. J.; Glick, G. D., The effect of cross-links on the conformational dynamics of duplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25* (4), 836-842.
261. (a) Cain, R. J.; Zuiderweg, E. R. P.; Glick, G. D., Solution structure of a DNA hairpin and its disulfide cross-linked analog. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23* (12), 2153-2160; (b) Wang, H.; Zuiderweg, E. R. P.; Glick, G. D., Solution Structure of a Disulfide Cross-Linked DNA Hairpin. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (11), 2981-2991.
262. (a) Maglott, E. J.; Glick, G. D., Probing structural elements in RNA using engineered disulfide cross-links. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26* (5), 1301-1308; (b) Goodwin, J. T.; Osborne, S. E.; Scholle, E. J.; Glick, G. D., Design, synthesis, and analysis of yeast tRNA(Phe) analogs possessing intra- and interhelical disulfide cross-links. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (22), 5207-5215.
263. Maglott, E. J.; Goodwin, J. T.; Glick, G. D., Probing the Structure of an RNA Tertiary Unfolding Transition State. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (32), 7461-7462.
264. (a) El-Sagheer, A. H.; Brown, T., New strategy for the synthesis of chemically modified RNA constructs exemplified by hairpin and hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*

- (35), 15329-15334; (b) Stage-Zimmermann, T. K.; Uhlenbeck, O. C., A covalent crosslink converts the hammerhead ribozyme from a ribonuclease to an RNA ligase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2001**, *8* (10), 863-867.
265. Blount, K. F.; Uhlenbeck, O. C., Internal Equilibrium of the Hammerhead Ribozyme Is Altered by the Length of Certain Covalent Cross-Links. *Biochemistry* **2002**, *41* (21), 6834-6841.
266. (a) Cohen, S. B.; Cech, T. R., Dynamics of Thermal Motions within a Large Catalytic RNA Investigated by Cross-linking with Thiol-Disulfide Interchange. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (27), 6259-6268; (b) Earnshaw, D. J.; Masquida, B. t.; Müller, S.; Sigurdsson, S. T.; Eckstein, F.; Westhof, E.; Gait, M. J., Inter-domain cross-linking and molecular modelling of the hairpin ribozyme1. *J. Mol. Biol.* **1997**, *274* (2), 197-212.
267. (a) Dupouy, C.; Millard, P.; Boissonnet, A.; Escudier, J.-M., α , β -D-CNA preorganization of unpaired loop moiety stabilizes DNA hairpin. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (28), 5142-5144; (b) Hilbers, C. W.; Haasnoot, C. A. G.; de Bruin, S. H.; Joordens, J. J. M.; Van Der Marel, G. A.; Van Boom, J. H., Hairpin formation in synthetic oligonucleotides. *Biochimie* **1985**, *67* (7), 685-695.
268. Nakano, S.-i.; Kirihata, T.; Fujii, S.; Sakai, H.; Kuwahara, M.; Sawai, H.; Sugimoto, N., Influence of cationic molecules on the hairpin to duplex equilibria of self-complementary DNA and RNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (2), 486-494.
269. (a) Mujeeb, A.; Clever, J. L.; Billeci, T. M.; James, T. L.; Parslow, T. G., Structure of the dimer initiation complex of HIV-1 genomic RNA. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5* (6), 432-436; (b) Tam, V. K.; Kwong, D.; Tor, Y., Fluorescent HIV-1 Dimerization Initiation Site: Design, Properties, and Use for Ligand Discovery. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (11), 3257-3266; (c) Bernacchi, S.; Ennifar, E.; Tóth, K.; Walter, P.; Langowski, J.; Dumas, P., Mechanism of Hairpin-Duplex Conversion for the HIV-1 Dimerization Initiation Site. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (48), 40112-40121.
270. St Louis, D. C.; Gotte, D.; Sanders-Buell, E.; Ritchey, D. W.; Salminen, M. O.; Carr, J. K.; McCutchan, F. E., Infectious molecular clones with the nonhomologous dimer initiation sequences found in different subtypes of human immunodeficiency virus type 1 can recombine and initiate a spreading infection in vitro. *J. Virol.* **1998**, *72* (5), 3991-3998.
271. Badorrek, C. S.; Weeks, K. M., Architecture of a Gamma Retroviral Genomic RNA Dimer. *Biochemistry* **2006**, *45* (42), 12664-12672.
272. Paillart, J. C.; Berthoux, L.; Ottmann, M.; Darlix, J. L.; Marquet, R.; Ehresmann, B.; Ehresmann, C., A dual role of the putative RNA dimerization initiation site of human immunodeficiency virus type 1 in genomic RNA packaging and proviral DNA synthesis. *J. Virol.* **1996**, *70* (12), 8348-8354.
273. Muriaux, D.; Fossé, P.; Paoletti, J., A Kissing Complex Together with a Stable Dimer Is Involved in the HIV-1Lai RNA Dimerization Process in Vitro. *Biochemistry* **1996**, *35* (15), 5075-5082.
274. Ennifar, E.; Bernacchi, S.; Wolff, P.; Dumas, P., Influence of C-5 halogenation of uridines on hairpin versus duplex RNA folding. *RNA* **2007**, *13* (9), 1445-1452.
275. Zheng, M.; Wang, Y.; Shi, H.; Hu, Y.; Feng, L.; Luo, Z.; Zhou, M.; He, J.; Zhou, Z.; Zhang, Y.; Ye, D., Redox-Mediated Disassembly to Build Activatable Trimodal Probe for Molecular Imaging of Biothiols. *ACS Nano*. **2016**, *10* (11), 10075-10085.

Bibliographie

276. Xu, H.; Hepel, M., "Molecular Beacon"-Based Fluorescent Assay for Selective Detection of Glutathione and Cysteine. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (3), 813-819.
277. Ogren, P. J.; Meetze, A.; Duer, W. C., The Limit of Detection in Generalized Least-Squares Calibrations: An Example Using Alprazolam Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Data. *J. Anal. Toxicol.* **2009**, *33* (3), 129-142.
278. Armbruster, D. A.; Pry, T., Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clin Biochem. Rev.* **2008**, *29* (Suppl 1), 49-52.

Annexes



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Gymnotic delivery and gene silencing activity of reduction-responsive siRNAs bearing lipophilic disulfide-containing modifications at 2'-position



Florian Gauthier^a, Sandra Claveau^b, Jean-Rémi Bertrand^b, Jean-Jacques Vasseur^a,
Christelle Dupouy^a, Françoise Debart^{a,*}

^a IBMM, Université de Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

^b UMR 8203 CNRS, Université Paris-Sud, Gustave Roussy, University Paris-Saclay, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Gene silencing
Disulfide-containing groups
Reduction-responsive
Gymnotic delivery
siRNA

ABSTRACT

Modified oligoribonucleotides used as siRNAs bearing biolabile disulfide-containing groups at some 2'-positions were synthesized following a post-synthesis transformation of solid-supported 2'-O-acetylthiomethyl RNA, previously described. Thus, the reduction-responsive and lipophilic benzylidithiomethyl (BnSSM) modification was introduced at different locations into siRNAs targeting the Ewing sarcoma EWS-Fli1 protein. Thermal stability, serum stability and response to glutathione treatment of modified siRNAs were thoroughly investigated. Among 17 modified siRNAs, significant gene silencing activities were demonstrated for the 8 most stable siRNAs in serum (half-life > 1 h) when using a transfection reagent. Of special interest, two naked 2'-O-BnSSM siRNAs transfection exhibited a remarkable gene silencing activity after 24 h incubation. These inhibitions are consistent with an efficient gymnotic delivery demonstrated by the presence of the corresponding fluorescent siRNAs within cells.

1. Introduction

Synthetic small interfering RNAs (siRNAs) represent powerful therapeutic tools to selectively silence the expression of any gene by an RNA interference (RNAi) mechanism.^{1,2} Thus double-stranded siRNAs consist of one sense strand (S) and one antisense strand (AS), taken in charge by the RISC complex, which binds the complementary target messenger RNA (mRNA) to cause its degradation. However, two major limitations to the use of siRNAs in therapy remain their fragility in biological fluids and their ineffective cellular uptake. To overcome these drawbacks, several strategies have been developed for many years and especially permanent chemical modifications were introduced into siRNAs.^{3,4} However only a few modifications at 2' position were tolerated on the antisense strand. For example 2'-deoxy-2'-fluoro (2'F) and 2'-O-methyl (2'-O-Me) modifications within the antisense strand showed siRNA activity *in vitro* whereas 2'-O-methoxyethyl (2'-O-MOE) modifications were not recognized by the RISC complex.^{5,6} Martínez-Montero et al. have incorporated the 2'-deoxy-2',4'-difluoro modification into the middle of the antisense strand to afford siRNAs as active as 2'F-siRNAs.⁷

In the search of a more effective strategy, another approach consists of using non-permanent modifications which are responsive to various

stimuli (heat, light, enzymes, glutathione...), similarly to a prodrug approach. In this context, several teams including ours have been working with biolabile modifications in oligonucleotides (ONs).⁸ Particularly, we focused on siRNAs bearing acetalester groups at some 2'-O-positions which could be removed by esterases inside the cells.^{9–13} Recently, we provided evidence for gene inhibition after the spontaneous naked delivery of a 2'-O-phenylisobutyryloxymethyl (PiBuOM) modified siRNA.¹⁴ Despite this promising result, 2'-O-PiBuOM groups were shown too stable, and the prodrug approach could not be validated. Nevertheless, PiBuOM groups were used as lipophilic permanent modifications in the sense strand and are totally relevant to improve the cellular uptake and consequently the gene silencing.

Another remarkable biolabile modification which was introduced at 2'-O-position in ONs is represented by the disulfide-containing groups. In this case, the prodrug activation trigger is the intracellular glutathione (GSH) whose concentration inside the cell is in the millimolar range (1–10 mM) whereas its concentration outside the cell is at micromolar (20–40 μM) levels. Moreover, in tumor cells concentration of glutathione is much higher than in normal cells.^{15,16} In this aim, first 2'-O-methyldithiomethyl (2'-O-MDTM)-modified ONs were shown to be converted into the corresponding 2'-OH ONs under reducing conditions.¹⁷ Lately, Urata and his group¹⁸ found that the 2'-O-MDTM-

* Corresponding author.

E-mail address: francoise.debart@umontpellier.fr (F. Debart).

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.07.033>

Received 8 June 2018; Received in revised form 9 July 2018; Accepted 19 July 2018

Available online 27 July 2018

0968-0896/ © 2018 Published by Elsevier Ltd.

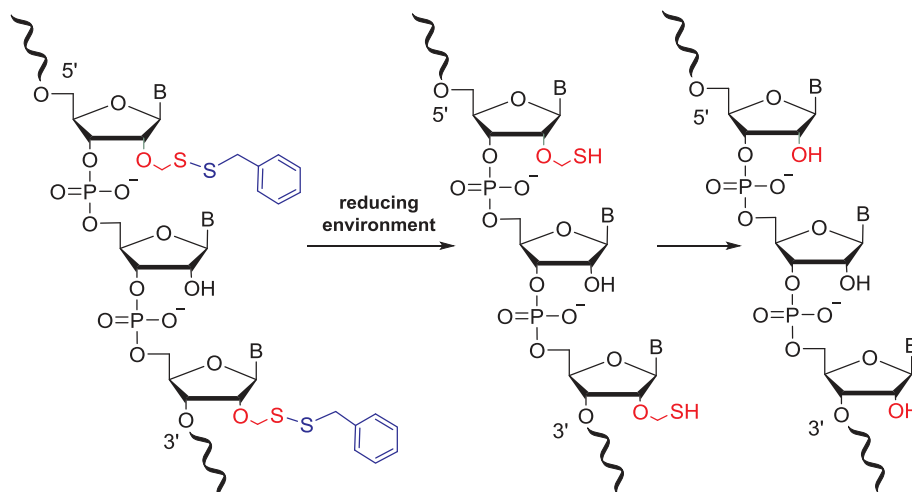


Fig. 1. Conversion of 2'-O-benzylthiomethyl (2'-O-BnSSM)-modified RNA into native RNA under reducing environment.

modified siRNAs transfected with lipofectamine were strongly able to inhibit luciferase expression regardless of the modification position suggesting that the MDTM groups could be removed in an intracellular reducing environment. More recently, the same authors demonstrated that 2'-O-MDTM modifications at the 5'-end and in the seed region of the antisense strand were well tolerated in comparison with 2'-OME siRNAs.¹⁹ These results demonstrated that the use of biolabile disulfide-containing groups is promising for a siRNA prodrug approach. In the same way, we selected various 2'-O-alkyldithiomethyl (RSSM) groups containing either lipophilic moieties or polar groups for modifying 2'-OH of RNAs.²⁰ These modifications provided high nuclease resistance to RNA and were rapidly removed under glutathione treatment. These preliminary data merited further investigations on the capability of differently 2'-O-RSSM-siRNAs to inhibit gene expression.

In this aim, in the present study the lipophilic 2'-O-benzylthiomethyl (BnSSM) biolabile modification was preferred to increase overall hydrophobic features of siRNAs and consequently to improve their cellular uptake without assistance of any transfecting agent (Fig. 1). Thermal and enzymatic stabilities of 17 2'-O-BnSSM modified siRNAs were also evaluated, and their conversion into the native siRNA was shown under reductive conditions. The cell penetration in the absence of any transfecting reagent and the gene silencing activity of the most stable 2'-O-BnSSM siRNAs in serum were studied in A673 human Ewing's sarcoma cells.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of 2'-O-BnSSM-modified oligoribonucleotides

For the synthesis of 2'-O-BnSSM ONs, we used the versatile post-synthesis method reported by us that allows the introduction of a variety of RSSM groups from the same starting supported 2'-O-acetylthiomethyl (2'-O-AcSM) RNA.²⁰ Several 2'-O-BnSSM-modified ONs whose sequences correspond to the sense strand (S) or the antisense strand (AS) of siRNA (siEF-4) targeting the Ewing sarcoma EWS-Fli1 protein²¹ have been designed. Some modifications were positioned at different sites: at the 5'-end (2 and 7), at the 3'-end (3 and 6), at both ends (5 and 8) or scattered on the strand (5 and 9) (Table 1). The partially modified ONs were assembled on an automated DNA synthesizer on 1 μ mol scale with 2'-O-AcSM amidites **1a-d**^{20,22} (precursors of 2'-O-BnSSM nucleotides) and commercially available 2'-O-pivaloyloxymethyl (2'-O-PivOM) phosphoramidites (Chemgenes Corp.) by using an RNA synthesis method developed by us (Scheme 1).²³ After RNA elongation, the thiol-disulfide exchange reaction between a thiolate resulting from the acetyl cleavage of AcSM group and the

benzyl-disulfanyl-pyridine derivative was performed on solid support as previously described.²⁰ A 25% butylamine in THF treatment was applied for 15 min to form the disulfide (S-S) bond, and cyanoethyl groups were likewise eliminated from phosphates. Then a final aqueous concentrated ammonia treatment removed nucleobase protecting groups, 2'-O-PivOM groups and released ONs from solid support. The relative percentage of peak area corresponding to the modified 2'-O-BnSSM ONs in the crude material represents from 35% to 55% in the IEX-HPLC chromatogram monitored at 260 nm. Larger the number of BnSSM modifications (7 modifications for **5** and **9**), lower the modified ON relative amount (35% and 37%, respectively). The crude ONs were purified by IEX-HPLC and the resulting isolated ONs **2-9** were characterized using MALDI-TOF mass spectrometry. Reasonable amounts of all desired 2'-O-BnSSM ONs **2-9** were obtained with high spectrophotometric purity (Table 1, Figs. S1–S11).

2.2. Design of 2'-O-BnSSM-modified siRNAs

With ONs **2-9** in hand, 17 diverse 2'-O-BnSSM siRNAs have been designed and the modifications were differently positioned in the sense strand or/and the antisense strand (Table 2). siRNA A presents a highly modified sense strand **5** with 7 BnSSM groups and an unmodified AS strand. In the same way, siRNAs I, O, Q were formed with a modified sense strand **2-4** and the unmodified AS strand. The most deeply modified siRNA E contains 14 modifications in total with 7 BnSSM groups spread out on each strand. siRNAs C, D, E have been designed with the 7 BnSSM-modified antisense strand **9** to evaluate the effect of the reduction-responsive modifications on silencing of gene expression. With the same goal, siRNAs J, K, L, P were formed with diversely modified antisense strands **6-9** that were hybridized to the native S strand.

2.3. Thermal stability and circular dichroism studies

The influence of the BnSSM modifications on thermal stability of the various siRNAs A–Q was evaluated by UV-melting experiments at 260 nm (Table 2, Figs. S12–13). Compared to the unmodified duplex siEF-4, 2'-O-BnSSM-modified duplexes were destabilized from -1.3 °C to -9.6 °C for A–H and -3.5 °C to -14.6 °C for I–Q (Table 2). However, the destabilizing effect per modification remains weak, from -0.1 to -0.7 °C for A–H and -0.9 to -2.1 °C for I–Q, and it was not detrimental to the formation of stable duplexes under physiological conditions. Surprisingly, the duplex O formed with the native antisense AS and a 3'-end modified sense strand **3** was slightly more stable than siEF-4 ($\Delta T_m + 0.9$ °C). Overall modified siRNAs are stable enough to be

Table 1
Sequences and data on unmodified and 2'-O-BnSSM-modified oligoribonucleotides.

ON ^a	RNA sequences ^b	% ON ^c	MALDI-TOF MS ^d		Isolated material (nmol) ^e
			Calcd.	Found	
S	5' GCAGCAGAACCCUUCUUAUGA 3'	/	/	/	/
2	5' G _R CA _R GC _R AG _R AACCCUUCUUAUGA 3'	35	7329.1	7328.7	35.5
3	5' GCAGCAGAACCCUUC _R UU _R AU _R GA 3'	55	7160.8	7159.9	40.6
4	5' G _R CA _R GC _R AGAACCCUUC _R UU _R AU _R GA 3'	50	7665.7	7664.2	27.9
5	5' G _R CAGC _R AG _R ACC _R CUU _R CUU _R AU _R GA 3'	35	7834.0	7832.9	24.3
Cy3-5	5' Cy3-G _R CAGC _R AG _R ACC _R CUU _R CUU _R AU _R GA 3'	21	8360.5	8359.9	43.0
AS	5' AUAAGAAGGUUCUGGCC 3'	/	/	/	/
6	5' AUAAGAAGGUUCUG _R CU _R GC _R CC 3'	50	7216.9	7215.7	31.3
7	5' A _R UA _R AG _R AA _R GGGUUCUGGCC 3'	42	7385.2	7384.1	57.5
8	5' A _R UA _R AG _R AAGGUUCUG _R CU _R GC _R CC 3'	42	7721.7	7719.6	36.1
9	5' A _R UAA _R GAA _R GGG _R UUC _R UGC _R UGC _R CC 3'	37	7890.0	7889.5	32.1

^a S = sense strand; AS = antisense strand.

^b C_R, A_R, G_R, U_R = 2'-O-BnSSM ribonucleotides; G, C, A, U = 2'-OH ribonucleotides.

^c Relative percentage of peak area corresponding to the 2'-O-BnSSM ONs in the crude material, as calculated by integration of the IEX-HPLC chromatogram monitored at 260 nm.

^d Negative mode. The calculated masses refer to the [M - H] peak.

^e Amount of 2'-O-BnSSM modified ONs after purification by IEX-HPLC, determined by UV measurement at 260 nm.

evaluated in a gene silencing assay at 37 °C.

Furthermore, circular dichroism (CD) spectra of all modified duplexes showed the typical curve of an A-form helix geometry with a strong negative band at 210 nm and a positive band near 264 nm (Figs. S14–15). It is noteworthy that the CD intensities of siRNAs A–H were decreased compared to the CD intensity of siEF-4 (Fig. S14). The CD intensity of A with a modified sense strand is slightly decreased whereas the lowest intensity was observed for H which contains six or seven 2'-O-BnSSM ribonucleotides in each strand, suggesting that these arrangements of 2'-modifications might affect the base pair stacking interaction. In contrast, no significant changes were observed in the CD spectra of I–Q with most of the modifications positioned in one strand (Fig. S15). Overall all modified siRNAs adopt an A-form conformation required for silencing activity.

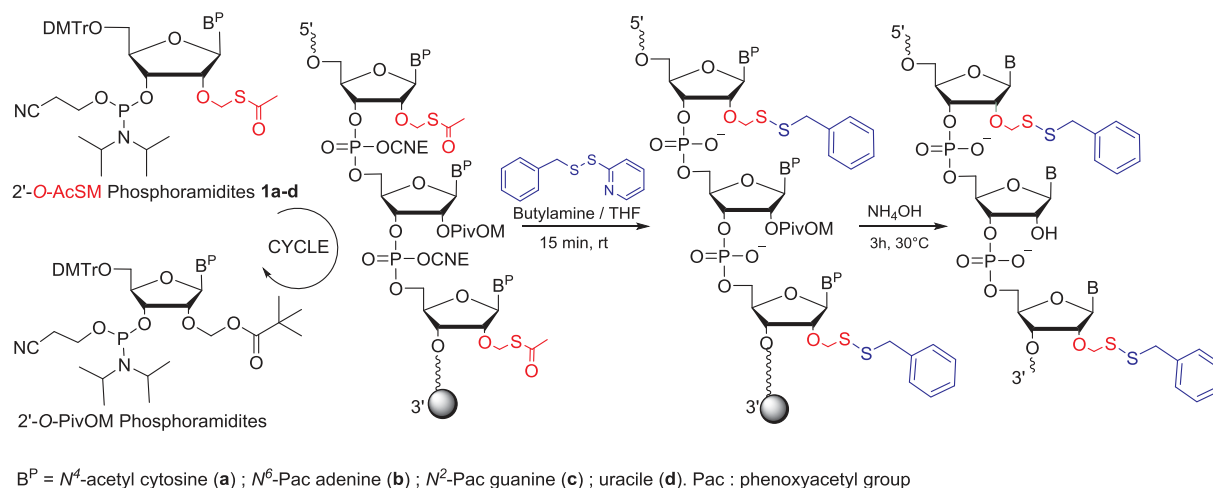
2.4. Serum stability

siRNAs A–Q were incubated in 10% human serum at 37 °C for 8 h and their stability was monitored by gel electrophoresis (Figs. S16–17). Unmodified siEF-4 and siRNAs I, J and N with BnSSM modifications at the 5' end of the sense or/and antisense strand were rapidly degraded (half-life < 5 min) (Table 2, Fig. S17). This indicates that the modifications at 5' ends of either the sense S or antisense AS strand do not

protect the siRNAs from enzymatic degradation. In contrast, the BnSSM groups at the 3' end, both ends or scattered on the sense or/and antisense strand (A, D, E and H) conferred greater resistance in human serum. More particularly, the eight duplexes A–H showed a half-life superior to 60 min (Table 2). In addition, siRNAs A–H and L, N, O were incubated in 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C confirming that the duplexes L, N and O modified at the 5' end are less stable than siEF-4 (Table 2, Fig. S18). In contrast, siRNAs A, E, F and H exhibited a remarkable stability higher than 480 min. These results show that the modifications at 3' end, at both ends and spread over the strand slow down enzymatic degradation of siRNAs. Therefore, solely the most nuclease resistant duplexes A–H have been assayed as RNAi gene silencers.

2.5. Glutathione treatment on 2'-O-BnSSM-modified siRNAs

The conversion of siRNAs A–H into unmodified siEF-4 was evaluated in the presence of 5.6 mM glutathione at pH 8 and was monitored by IEX-HPLC over a 24 h period (Figs. S19–S26). The BnSSM group removal consists of two steps. After 1 min incubation, for all duplexes the peak corresponding to the modified siRNA disappeared suggesting that the S-S bond was cleaved quite fast. In contrast, as previously reported by Semenyuk et al. for the *tert*-butyldithiomethyl (DTM) group,



Scheme 1. Synthesis of 2'-O-BnSSM-modified oligoribonucleotides.

Table 2

Data for 2'-O-BnSSM-modified siRNAs A-Q: thermal stability and enzymatic stabilities in human serum (HS) and fetal bovine serum (FBS).

siRNA	ON ^a	Sequences ^b	T _m ^c (°C)	ΔT _m ^d (°C)	ΔT _m /mod ^e (°C)	Half-life HS ^f (min)	Half-life FBS ^g (min)
siEF-4	S	5' GCAGCAGAACCCUUCUUAUGA 3'	75.6	–	–	< 5	137
	AS	3' CCCGUCGUCUUGGGAAGAAUA 5'					
A	5	5' G _R CAGC _R AG _A ACC _R CUU _R CUU _R AU _R GA 3'	66.9	–8.7	–1.2	174	> 480
	AS	3' CCCGUCGUCUUGGGAAGAAUA 5'					
B	3	5' GCAGCAGAACCCUUC _R UU _R AU _R GA 3'	73.2	–2.4	–0.4	84	242
	6	3' CCC _R GU _R CG _R UCUUGGGAAGAAUA 5'					
C	3	5' GCAGCAGAACCCUUC _R UU _R AU _R GA 3'	69.0	–6.6	–0.7	125	216
	9	3' CCC _R GU _R CG _R UCUUGGGAAGAAUA 5'					
D	4	5' G _R CA _R GC _R AGAACCCUUC _R UU _R AU _R GA 3'	66.0	–9.6	–0.7	82	72
	9	3' CCC _R GU _R CG _R UCUUGGGAAGAAUA 5'					
E	5	5' G _R CAGC _R AG _A ACC _R CUU _R CUU _R AU _R GA 3'	67.3	–8.3	–0.6	316	> 480
	9	3' CCC _R GU _R CG _R UCUUGGGAAGAAUA 5'					
F	3	5' GCAGCAGAACCCUUC _R UU _R AU _R GA 3'	74.3	–1.3	–0.1	83	> 480
	8	3' CCC _R GU _R CG _R UCUUGGGAAGAAUA 5'					
G	4	5' G _R CA _R GC _R AGAACCCUUC _R UU _R AU _R GA 3'	73.0	–2.6	–0.2	92	110
	8	3' CCC _R GU _R CG _R UCUUGGGAAGAAUA 5'					
H	5	5' G _R CAGC _R AG _A ACC _R CUU _R CUU _R AU _R GA 3'	66.9	–8.7	–0.7	79	> 480
	8	3' CCC _R GU _R CG _R UCUUGGGAAGAAUA 5'					
I	2	5' G _R CA _R GC _R AG _A AACCCUUCUUAUGA 3'	67.2	–8.4	–2.1	< 5	–
	AS	3' CCCGUCGUCUUGGGAAGAAUA 5'					
J	5	5' GCAGCAGAACCCUUCUUAUGA 3'	70.5	–5.1	–1.3	< 5	–
	7	3' CCCGUCGUCUUGGGAAGAAUA 5'					
K	5	5' GCAGCAGAACCCUUCUUAUGA 3'	66.0	–9.6	–1.4	< 5	–
	9	3' CCC _R GU _R CG _R UCUUGGGAAGAAUA 5'					
L	5	5' GCAGCAGAACCCUUCUUAUGA 3'	72.1	–3.5	–1.2	12	37
	6	3' CCC _R GU _R CG _R UCUUGGGAAGAAUA 5'					
M	5	5' G _R CAGC _R AG _A ACC _R CUU _R CUU _R AU _R GA 3'	67.8	–7.8	–0.8	54	–
	6	3' CCC _R GU _R CG _R UCUUGGGAAGAAUA 5'					
N	2	5' G _R CA _R GC _R AG _A AACCCUUCUUAUGA 3'	61.0	–14.6	–1.8	< 5	< 5
	7	3' CCCGUCGUCUUGGGAAGAAUA 5'					
O	3	5' GCAGCAGAACCCUUC _R UU _R AU _R GA 3'	76.5	+0.9	+0.3	19	52
	AS	3' CCCGUCGUCUUGGGAAGAAUA 5'					
P	5	5' GCAGCAGAACCCUUCUUAUGA 3'	70.5	–5.1	–1.3	28	–
	8	3' CCC _R GU _R CG _R UCUUGGGAAGAAUA 5'					
Q	4	5' G _R CA _R GC _R AGAACCCUUC _R UU _R AU _R GA 3'	70.1	–5.5	–0.9	37	–
	AS	3' CCCGUCGUCUUGGGAAGAAUA 5'					

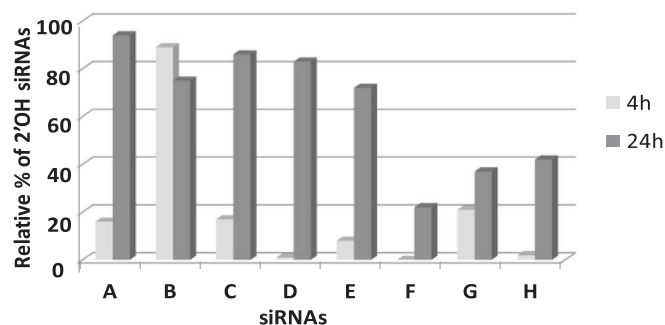
^a S = sense strand and AS = antisense strand.^b C_R, A_R, G_R, U_R = 2'-O-BnSSM ribonucleotides; G, C, A, U = 2'-OH ribonucleotides.^c T_m values (°C) obtained from UV melting curves at 260 nm with 1.5 μM strand concentration in 10 mM sodium cacodylate, 100 mM NaCl, pH 7.0. Data are averages of two hybridization/melting cycles. Estimated errors in T_m = ± 0.5 °C.^d ΔT_m is the difference in T_m relative to the unmodified duplex siEF-4.^e ΔT_m/mod is the difference in T_m relative to the unmodified duplex per modification.^f Half-lives were determined in 10% human serum (HS).^g Half-lives were determined in 10% fetal bovine serum (FBS).

Fig. 2. IEX-HPLC purity of the resulting siEF-4 obtained after 4 h and 24 h incubation of modified siRNAs A–H with 5.6 mM glutathione.

the subsequent conversion of the thiohemiformal intermediate into the 2'-OH liberating a molecule of thioformaldehyde is rather slow (120 min at 20 °C pH 8 with tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) or dithiothreitol for one DTM group in a dinucleotide).²⁴ The rate of conversion into siEF-4 was not similar for all BnSSM modified duplexes A–H (Fig. 2). For example, after 4 h incubation only 16% or 2% of the native siEF-4 was generated from A or H, respectively. Broad peaks with shorter retention time than that of modified siRNA were noticeable. (Fig. 3). As we already reported,²⁰ these broad peaks observed at 2 h, 4 h, 8 h and 24 h might correspond to the thiohemiformal species resulting from the cleavage of the S-S bond. After 24 h, 94% of A was converted into siEF-4 whereas only 42% of H was converted (Figs. 2 and 3). Furthermore, for siRNAs F and G with modifications positioned opposite onto the sense and the antisense strand, only 20% and 30% were converted to unmodified siEF-4, respectively (Figs. 2 and

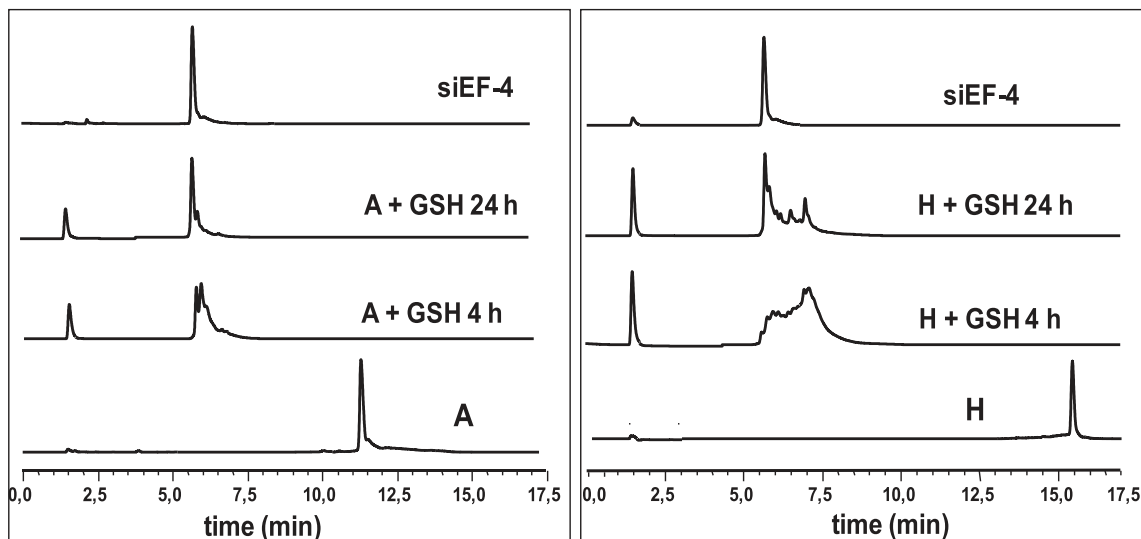


Fig. 3. Reductive conversion of siRNAs A and H upon 5.6 mM glutathione incubation at 37 °C and pH 8, monitored by IEX-HPLC over a 24 h period.

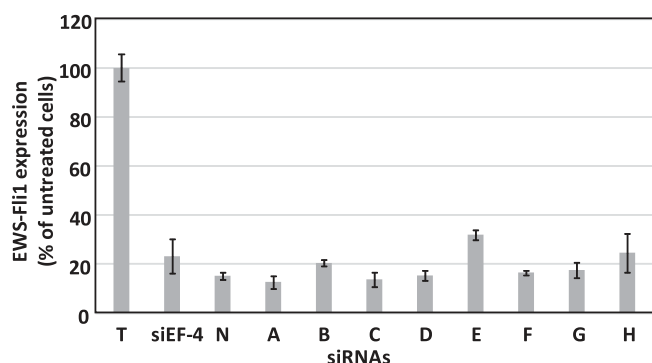


Fig. 4. Inhibition of EWS-Fli1 expression in A673 human Ewing's sarcoma cells by 2'-O-BnSSM-modified siRNAs A–H vectorized with lipofectamine 2000. A673 cells were treated with 50 nM unmodified siEF-4 or 2'-O-BnSSM siRNAs A–H and N in complex with lipofectamine for 2 h in serum-free OptiMEM followed by 24 h incubation in DMEM containing 10% FCS. EWS-Fli1 expression levels were measured by RT-qPCR 24 h post-transfection and normalized by G3PDH expression. The results are expressed as the percentages of EWS-Fli1 expression measured in untreated cells (T) set at 100%. Each experiment was performed in triplicate.

S22–23). To explain this result, we could speculate on the formation of some disulfide bridges between the sense and the antisense strands for siRNAs F, G and H. Therefore, to study the course of the reduction reaction with a simple model we submitted ON 6 modified by 3 BnSSM groups at 3'-end to a GSH treatment. After 4 h incubation, the peak corresponding to the initial ON 6 disappeared in the HPLC chromatogram and two new peaks of shorter retention time were detectable (Fig. S27). The major one corresponds to the fully 2'-OH unmodified ON AS (m/z 6712.3) and the minor peak of higher retention time corresponds to an ON with 2 remaining $\text{CH}_2\text{-SH}$ (m/z 6802.1). After 24 h incubation with GSH, the fully 2'-OH ON represents the major compound in the reaction mixture nevertheless by MS we could identify new species corresponding to glutathione disulfide adducts at m/z 7106 (one GSH adduct and one remaining CH_2SH) and at m/z 7411 (2 GSH residues attached to ON via a disulfide link). The formation of some GSH disulfide adducts occurs to some extent over time.

However, it is noteworthy that this study was performed on a single strand and we can hypothesize that some GSH adducts are also formed during the conversion of BnSSM modified siRNA duplexes even though we could not detect these GSH adducts in MS spectra (Figs. S19–S26). These results indicate that depending on the number and the position of

the BnSSM modifications within a siRNA, the conversion of CH_2SH intermediates into 2'-OH may require time. Consequently, a side reaction with glutathione generating GSH disulfide adducts may occur as well as the formation of a disulfide bridge between both strands of siRNAs. Nevertheless, the main species released by the GSH treatment remains the native si-EF4.

2.6. Gene silencing activity targeting EWS-Fli1 mRNA

To evaluate the gene inhibition potencies of 2'-O-BnSSM-modified siRNAs, we selected solely siRNAs A–H showing the best stability in human serum with half-lives superior to 1 h (Table 2). The investigations were performed in human Ewing's sarcoma cells (A673) established from a patient with a bone tumor. First, we examined the inhibition of EWS-Fli1 expression by siRNAs in using an effective transfection reagent (Lipofectamine® 2000) to bypass influences of cellular uptake and intracellular release. All siRNAs were transfected at 50 nM into A673 cells expressing EWS-Fli1. This EWS-Fli1 mRNA expression was measured by RT-qPCR after 24 h incubation. Relative to the unmodified siEF-4 with 80% inhibition, all 2'-O-BnSSM siRNAs A–H and the control N which was unstable in serum (half-life < 5 min) showed gene suppression activity in the same range from 70% (for the least efficient E) to 90% (for the most efficient A) (Fig. 4). Therefore, these results indicate that BnSSM modifications are either well-tolerated in both strands of siRNAs and do not hamper activity.

The capacity of BnSSM modifications to protect siRNAs against enzymatic degradation and to facilitate cell penetration was assessed in A673 cells grown in serum-containing medium without the use of a transfection reagent. EWS-Fli1 expression was measured by RT-qPCR after 24 h incubation with 500 nM of siEF-4 or 2'-O-BnSSM siRNAs A–H and N. Except for A and H for which 50% and almost 30% inhibition were measured respectively, at most 5% to 20% inhibition was observed for all other modified siRNAs in the same range as for unmodified siEF-4 (10% inhibition) (Fig. 5). As depicted in the experiment with transfection reagent, siRNA A with 7 modifications in the sense strand and with an unmodified AS strand was the most efficient. This data may suggest that either siRNAs B–G do not enter the cells efficiently or BnSSM modifications positioned in the antisense strand of siRNAs B–G have been detrimental to the activity of siRNAs. In contrast, the seven BnSSM modifications in the sense strand of siRNAs A and H have certainly improved their cellular uptake. Moreover, for A, the unmodified AS strand was able to play its role in the inhibition of EWS-Fli1 expression (50% inhibition) whereas in case of H, the partially

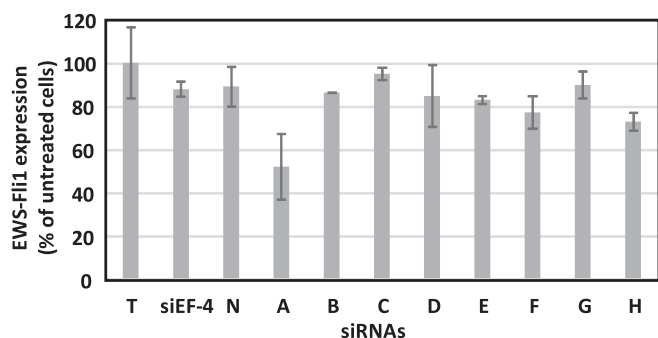


Fig. 5. Inhibition of EWS-Fli1 expression in A673 human Ewing's sarcoma cells by 2'-O-BnSSM siRNAs for 24 h without the use of a transfection reagent. A673 cells were incubated for 24 h with 500 nM siEF-4 or 2'-O-BnSSM siRNAs A–H and N in serum-containing DMEM medium. EWS-Fli1 expression levels were measured by RT-qPCR 24 h post-transfection and normalized as the percentages of EWS-Fli1 expression measured in untreated cells (T) set at 100%. Each experiment was performed in triplicate.

modified AS strand (3 BnSSM groups at both extremities) was slightly active (25–30% inhibition). As we previously showed on siRNA H treated with glutathione (Fig. 3), we can guess that the BnSSM modifications have not been completely removed under the reductive environment of A673 cells over a 24 h period of incubation. From these results, we further investigated gene silencing experiment with siRNA A bearing the modified sense strand 5 and the unmodified AS strand and which exhibited the best inhibition without transfecting agent. To evaluate the influence of the biolabile modifications on the antisense strand, we also selected siRNA E and H bearing the same 7 BnSSM-modified sense strand 5 and the antisense strand with 7 BnSSM spread out along the sequence (9), or 3 BnSSM positioned rather towards each extremity (8), respectively. This selection was justified by the same common feature of these three siRNAs which is the highly modified sense strand 5. This strand was expected to play a key role in the transport of these molecules.

An additional experiment of inhibition of EWS-Fli1 expression by siRNAs A, E and H was carried out over a 48 h period. In this assay, after 24 h incubation 65% inhibition was observed with A whereas 20% and 40% inhibition were obtained with E and H, respectively (Fig. 6). This experiment confirms that siRNA A is the most potent among the tested siRNAs. It is noteworthy that after 48 h incubation, its effect decreased from 65% to 42% inhibition while siRNAs E and H produced the nearly same effect (25% and 40% inhibition, respectively) on EWS-Fli1 expression. Probably A with unmodified AS has been partially degraded which may explain its lower efficiency than at 24 h

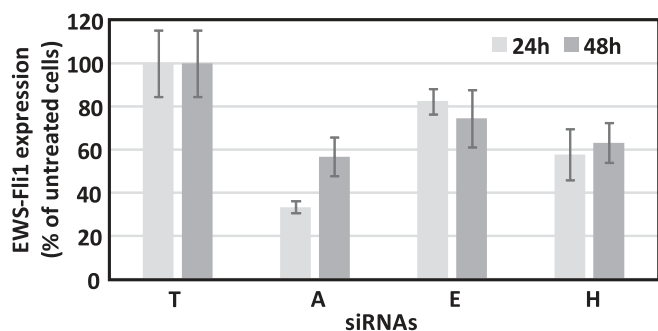


Fig. 6. Inhibition of EWS-Fli1 expression in A673 human Ewing's sarcoma cells by 2'-O-BnSSM siRNAs A, E and H for 24 h or 48 h without the use of a transfecting agent. A673 cells were incubated for 24 and 48 h with 500 nM 2'-O-BnSSM siRNAs A, E and H in serum-containing DMEM medium. EWS-Fli1 expression levels were measured by RT-qPCR 24 h and 48 h post-transfection and normalized as the percentages of EWS-Fli1 expression measured in untreated cells (T) set at 100%. Each experiment was performed in triplicate.

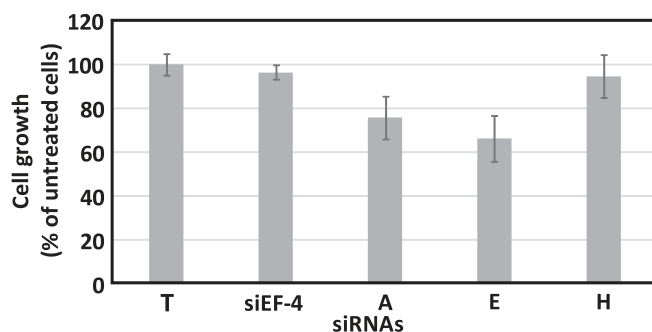


Fig. 7. Toxicity of 500 nM 2'-O-BnSSM siRNAs A, E and H in A673 human Ewing's sarcoma cells for 24 h in comparison to siEF-4. A673 cells were treated for 24 h in 96 wells plate by 500 nM siEF-4 or 2'-O-BnSSM siRNAs A, E and H in DMEM medium containing 10% serum. Cell growth was determined by a MTT test and expressed as a percentage of untreated cells (T). Results are the means of 6 wells.

incubation. These data strengthen that the reduction-responsive BnSSM modifications require > 48 h to be released from the antisense strand. In the same way, when the time course of the anti-luciferase activity of an siRNA modified by 8 MDTM groups and transfected by the Ca²⁺ enrichment in culture medium (CEM) method was evaluated, the strongest activity was obtained after 96 h incubation.¹⁹ It is noteworthy that the same 90% inhibition of luciferase expression was obtained with this modified siRNA and the natural siRNA. This result can be explained by the transfection with the CEM method that might inhibit enzymatic degradation, particularly of the natural siRNA. In our experiments, after 24 h incubation remarkable 40% and 65% inhibition were measured for H and A, respectively in spite of no assistance for siRNA delivery.

2.7. Toxicity

In addition, toxicity of siRNAs A, E and H at 500 nM concentration was then evaluated in A673 cells for 24 h. Compared to siEF-4 which did not show any toxicity, some toxicity (from 5% for H to 35% for E of cell growth reduction) was observed for the modified siRNAs (Fig. 7). Indeed, E which is the highest modified siRNA with 14 BnSSM groups in both strands is the more toxic whereas 25% of cell growth reduction were observed for A which contains 7 BnSSM modifications in the sense strand.

2.8. Cellular uptake

Next, the cellular penetration abilities of siRNAs A, E and H in A673 cells were investigated in the absence of a transfecting agent and in comparison with the penetration of unmodified siEF-4. For this, the sense ON Cy3-5 with a Cy-3 at 5'-end was synthesized on solid support using the commercially available Cy-3 phosphoramidite (Table 1). A673 cells were transfected with the Cy3-labeled siRNAs A, E and H at 500 nM concentration and were analyzed by epi-fluorescence microscopy after 3 h and 24 h incubation in DMEM containing 10% FCS (Fig. 8, Fig. S28). No red fluorescence was detected in the cells treated with siEF-4; this endorses the incapacity of unmodified siRNA to penetrate without any vectorization system. In contrast, after 3 h incubation red fluorescence was observed in the cells transfected with 2'-O-BnSSM-modified siRNAs, indicating efficient internalization which was more pronounced for Cy3-A with numerous fluorescent cells than for Cy3-E and Cy3-H with only few fluorescent cells. Naked delivery of siRNA A was more efficient than for siRNAs E and H. This result is surprising for E and H bearing 14 and 13 BnSSM groups in total, respectively since they are expected to be more lipophilic than A (7 BnSSM groups) and to enter cells more efficiently. Nevertheless, the cellular internalization is consistent with the measured inhibition of EWS-Fli1 expression.

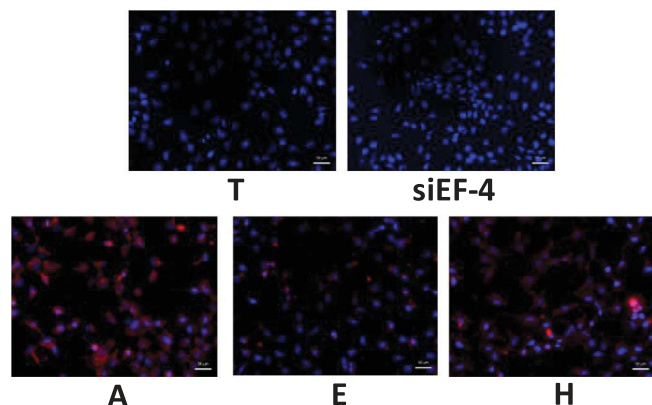


Fig. 8. Epi-fluorescence microscopy slides of A673 Ewing sarcoma cells treated with siEF-4 and Cy3-A, Cy3-E and Cy3-H at 500 nM concentration for 3 h at 37 °C in DMEM medium containing 10% FCS. Cell nuclei are colored blue by DAPI; Cy3-siRNAs are in red.

After 24 h incubation, surprisingly the intensity of fluorescence decreased in the cells treated with Cy3-A which may be due to the enzymatic degradation of the sense strand (Fig. S28). In the case of Cy3-E and Cy3-H, the intensity of fluorescence was similar to the one after 3 h incubation. This result is in agreement with the observed inhibition of EWS-Fli1 expression (Fig. 6) by siRNA A that decreases when increasing incubation time. In contrast, for siRNAs E and H the inhibition is not time-dependent. This may be due to a slower kinetics for the conversion of E and H into siEF-4 in comparison with A.

3. Conclusion

Eight oligoribonucleotides whose sequence corresponds to the sense or the antisense strand of siEF-4 targeting the Ewing sarcoma EWS-Fli1 protein were synthesized with benzyldithiomethyl (BnSSM) groups at several 2'-OH positions. These biolabile disulfide-containing groups were efficiently introduced using a thiol-disulfide exchange reaction between a thiolate resulting from the acetyl cleavage of acetylthiomethyl (AcSM) precursor and the benzyldisulfanyl-pyridine derivative. This reaction takes place on solid phase after RNA elongation using both 2'-O-PivOM and 2'-O-AcSM phosphoramidites. The pure 2'-O-BnSSM RNAs were used to design 17 diversely modified siRNAs whose stability in serum and thermal duplex stability were evaluated. The BnSSM modifications retard hybridization to a moderate extent and do not hamper an A-type double helix geometry, both features of siRNA required for silencing activities. The eight most stable siRNAs in serum (half-life > 1 h) were selected for further investigations. In particular, the conversion of these 2'-O-BnSSM siRNAs into the native siEF-4 was shown upon a 5.6 mM glutathione treatment mimicking the intracellular reducing environment, with variable conversion rates depending on the number and the position of the modifications within the siRNA. In the course of reduction reaction on a single RNA strand, some traces of glutathione disulfide adducts could be detected, they are formed from thiohemiformal intermediates over time. However, in spite of slow and variable unmasking, all the modified siRNAs assayed using a transfecting agent induced very similar inhibition of EWS-Fli1 protein expression suggesting an efficient unmasking of siRNAs in the cells. Moreover, naked delivery of two 2'-O-BnSSM siRNAs exhibited strong siRNA activities correlated to an efficient cell internalization and a high enzymatic stability. Apparently gene inhibition was dependent on the position of the modifications within antisense strand, consequently on its unmasking and its conversion into the native antisense. Thus, these reduction-responsive modifications represent an interesting approach to increase the therapeutic potential of siRNAs since both serum stability and gymnotic delivery of these analogs are addressed.

4. Materials and methods

4.1. General

Analytical and semi-preparative high performance liquid chromatography were performed on a Dionex DX 600 HPLC system equipped with anion-exchange DNAPac PA 100 columns (4 × 250 mm for analysis or 9 × 250 mm for semi-preparative purpose, Dionex), UV detection at 260 nm. The following HPLC solvent systems were used: 20% CH₃CN in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8 (buffer A) and 20% CH₃CN containing 200 mM NaClO₄ in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8 (buffer B). Flow rates were 1.0 mL·min⁻¹ and 4 mL·min⁻¹ for analysis and semi-preparative purposes, respectively. MALDI-TOF mass spectra were recorded on a Voyager-DE spectrometer equipped with a N₂ laser (337 nm) (PerSeptive Biosystems, USA) or a Axima assurance spectrometer equipped with a N₂ laser (337 nm) (Shimadzu Biotech) using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as a saturated solution in a mixture of acetonitrile/0.1 M ammonium citrate solution (1:1, v/v) for the matrix. Analytical samples were mixed with the matrix in a 1:5 (v/v) ratio, crystallized on a stainless steel plate and analyzed. UV quantifications of ONs were performed on a Varian Cary 300 Bio UV/Visible spectrometer by measuring absorbance at 260 nm.

4.2. Oligonucleotides synthesis and purification

RNA oligonucleotides 2–9 were synthesized using an ABI model 394 DNA/RNA synthesizer on a 1 μmol scale with commercially available 2'-O-PivOM phosphoramidites (Chemgenes) or 2'-O-AcSM phosphoramidites 1a–d and a long chain alkylamine (LCAA) controlled-pore glass (CPG) as solid support. Cy3-labeled ON Cy3-5 was synthesized using Cy3-phosphoramidite (GE Healthcare). Oligonucleotides were assembled in TWIST™ synthesis columns (Glen Research). Phosphoramidites were vacuum dried prior to their dissolution in extra dry acetonitrile (Biosolve) at 0.1 M concentration. Coupling for 180 s was performed with 5-benzylmercaptotetrazole (BMT, 0.3 M) as the activator. The oxidizing solution was 0.1 M iodine in THF/pyridine/H₂O (78:20:2; v/v/v) (Link Technologies). The capping step was performed with a mixture of 5% phenoxyacetic anhydride (Pac₂O) in THF and 10% N-methylimidazole in THF (Link Technologies). Detritylation was performed with 3% TCA in CH₂Cl₂. After RNA assembly completion, the column was removed from the synthesizer and dried under a stream of argon.

After RNA elongation, the solid support was treated with 1.5 mL of a 0.3 to 0.7 M solution of benzyldisulfanyl-pyridine (100 equiv. by modification) in 2.5 M butylamine (0.4 mL) and anhydrous THF (1.1 mL) using two glass syringes filled with 4 Å molecular sieves (5 beads each). The solution was pushed back and forth through the synthesis column for 15 min. After removal of the solution, the solid support was washed with anhydrous THF followed by a 1 min flush with argon. The solid support was treated with a 30% aqueous ammonia solution for 3 h at 30 °C. The deprotection solution was evaporated in the presence of isopropylamine (13% of total volume) under reduced pressure. The residue was dissolved in 1.5 mL of water and transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized.

The crude 2'-O-BnSSM oligonucleotides were analyzed and purified by IEX-HPLC using a specific linear gradient of buffer B in buffer A for each ON. The fractions containing pure ON were pooled in a 100 mL round-bottomed flask and were concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in 100 mL TEAAc buffer, pH 7 and the solution was desalted using a C₁₈ cartridge (Sep-Pak®, Waters) equilibrated with a 100 mM TEAAc buffer solution. The desired compound was eluted with a 12.5 mM TEAAc/CH₃CN (50/50) solution in a 100 mL round-bottomed flask and was lyophilized. The residue was dissolved in 1.5 mL water (divided in 3 portions 0.8 mL, 0.4 mL and 0.3 mL for flask rinse), transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized. Purified RNAs were characterized by MALDI-TOF

spectrometry and were quantified by UV measurement. Lyophilized RNAs were stored at -20°C for several months without any degradation.

4.3. Thermal denaturation studies

T_m experiments were performed using a CARY 300 UV Spectrophotometer (Varian Inc.) equipped with a Peltier temperature controller and thermal analysis software. The samples were prepared by mixing ON solutions of RNA sense and antisense strands together to give $1.5\ \mu\text{M}$ final concentration in $10\ \text{mM}$ sodium cacodylate, $100\ \text{mM}$ NaCl, pH 7 buffer in a $1\ \text{cm}$ path length quartz cell. A heating-cooling-heating cycle in the $0\text{--}90^{\circ}\text{C}$ temperature range with a gradient of $0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ was applied. T_m values were determined from the maxima of the first derivative plots of absorbance versus temperature. The T_m values from two independent experiments were accurate within $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The solutions were stored in $2\ \text{mL}$ Eppendorf-vials at -80°C .

4.4. CD spectroscopy studies

CD spectra were recorded on a Jasco J-815 spectropolarimeter. The solution used for T_m experiments were transferred into a $1\ \text{cm}$ path length quartz cell. Measurements were performed at 1°C with the wavelength range set to $340\text{--}200\ \text{nm}$ with a scanning speed of $100\ \text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$. Raw data were acquired over 2 scans.

4.5. Serum stability

For annealing complementary RNA strands, equimolar amounts of sense and antisense strand were incubated in H_2O milliQ for 5 min at 90°C followed by slow cooling to room temperature. siRNAs ($C = 100\ \mu\text{M}$, $V = 4\ \mu\text{L}$) were incubated with a Phosphate Buffered Saline solution (PBS) $10\times$ ($2.4\ \mu\text{L}$), H_2O milliQ ($15.2\ \mu\text{L}$) and a human serum AB type solution (Sigma) or a fetal bovine serum solution (FBS) (Sigma) ($2.4\ \mu\text{L}$) at 37°C . After 1 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min and 480 min, $3\ \mu\text{L}$ were withdrawn and immediately frozen and stored at -80°C until analysis. Each sample was then analyzed by gel electrophoresis (15% polyacrylamide) $20\ \text{W}$, $1.5\ \text{h}$ at 4°C . The gels were stained with GelRed $3\times$ (VWR) in a $0.1\ \text{M}$ NaCl solution for 1 h and revealed with UV transilluminator. Band analysis was performed using ImageJ Software (Broken Symmetry Software V:1.4.3.67). Half-lives were determined by the hypothesis of a first-order kinetic, the calculation was performed on Microsoft Office Excel with an exponential trend line given by $y(t) = Ae^{-kt}$ ($0.90 \leq R^2 \leq 1.00$).

4.6. Glutathione treatment

siRNA duplexes were annealed as previously described. $2\ \text{nmol}$ of duplexes ($10\ \mu\text{L}$) were mixed with $40\ \mu\text{L}$ of a glutathione-HEPES buffer ($34\ \text{mM}$ NaCl, $1\ \text{mM}$ MgCl_2 , $0.05\ \text{mM}$ EDTA, $7.5\ \text{mM}$ HEPES, $10\ \text{mM}$ glutathione, pH 8) and incubated at 37°C . After 1 min, 60 min, 120 min, 240 min and 480 min, aliquots ($10\ \mu\text{L}$) were collected and immediately frozen and stored at -80°C until analysis. Samples were diluted with water and analyzed by IEX-HPLC and MALDI-TOF MS.

4.7. Inhibition of EWS-Flt1 measurement by RT-qPCR

The protocol was very similar for both experiments with and without transfection reagent except for the incubation conditions with siRNAs. Therefore, this step was described separately.

One day before treatment, 3×10^5 human Ewing sarcoma cells A673 were seeded in 12 wells-plate in DMEM medium (Gibco, Life Technologies) containing 10% fetal calf serum (Gibco, Life Technologies) and 1% Penicillin, streptomycin solution (Gibco, Life

Technologies) and then incubated at 37°C , with 5% CO_2 and 95% hygrometry.

For experiments with a transfection reagent, $25\ \text{pmol}$ of siRNA ($50\ \text{nM}$ final concentration) in $25\ \mu\text{L}$ of $100\ \text{mM}$ NaCl, $10\ \text{mM}$ HEPES buffer pH 7.2 were mixed to $25\ \mu\text{L}$ of OptiMEM (Gibco, Life Technologies) containing $3\ \mu\text{g}$ of Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen). After 15 min incubation, $450\ \mu\text{L}$ of OptiMEM were added and the mixture was dropped to the cells for 2 h at 37°C , 5% CO_2 and 95% Hygrometry. Then, the medium was discarded and replaced by $500\ \mu\text{L}$ of DMEM, 10% fetal calf serum and 1% Penicillin, streptomycin solution and then incubated at 37°C , with 5% CO_2 and 95% hygrometry for 22 h.

For experiments without a transfection reagent, the medium was discarded and replaced by $500\ \mu\text{L}$ of $500\ \text{nM}$ siRNA in DMEM medium containing 10% fetal calf serum and 1% penicillin, streptomycin solution for 24 h or 48 h at 37°C , 5% CO_2 and 95% hygrometry.

After the medium was discarded, cells were lysed by $400\ \mu\text{L}$ of Trizol solution (Invitrogen) and collected in Eppendorf tubes. Total RNA were extracted by adding $60\ \mu\text{L}$ of chloroform:isoamyl alcohol (49:1). After centrifugation at $13,000\ \text{rpm}$ for 15 min at 10°C , $150\ \mu\text{L}$ of the aqueous phase was precipitated by isopropanol ($150\ \mu\text{L}$) for 15 min at room temperature followed by centrifugation for 15 min at $13,000\ \text{rpm}$. The pellets were washed twice with 70% ethanol solution and dried. The pellets were solubilized with water ($10\ \mu\text{L}$) containing $0.5\ \text{U}/\mu\text{L}$ of RNasin (Promega) and RNA were quantified with a nanodrop (Thermo). The cDNA was prepared by heating $1.5\ \mu\text{g}$ of RNA in $12.5\ \mu\text{L}$ of water at 75°C for 5 min with $2\ \mu\text{L}$ of $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ random primer (Promega). Then $4\ \mu\text{L}$ of $5 \times \text{M-MLV}$ buffer (Promega), $0.5\ \mu\text{L}$ dNTP $20\ \text{mM}$ (Promega), $0.5\ \mu\text{L}$ RNasin $40\ \text{U}/\mu\text{L}$ (Promega) and $0.5\ \mu\text{L}$ M-MLV RT $200\ \text{U}/\mu\text{L}$ (Promega) were added and incubation was performed for 15 min at 25°C followed by 1 h at 42°C . qPCR was performed on $5\ \mu\text{L}$ of $1/20$ diluted cDNA, $0.4\ \mu\text{L}$ of each one primer $10\ \text{mM}$, $4.2\ \mu\text{L}$ H_2O and $10\ \mu\text{L}$ of $2\times$ master mix Kapa syber fast (KAPABiosystems). PCR was performed for 40 cycles in fast mode on Stepone plus (Applied Biosystems). EWS-Flt1 gene was amplified with EWS-forward primer: 5'-AGC AGT TAC TCT CAG CAG AAC ACC-3' and Flt1 reverse: 5'-CCA GGA TCT GAT ACG GAT CTG GCC-3'. As a control, we used GAPDH gene with forward primer: 5'-CAA GGT CAT CCATGA CAA CTT TG-3', and reverse primer: 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3'. The comparative Ct method was used to normalize the target Ct by the GAPDH control gene Ct.

4.8. Inhibition of cell growth

One day before treatment, 10^4 human Ewing sarcoma cells A673 were seeded in 96 wells-plate in DMEM medium (Gibco, Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies) and 1% penicillin, streptomycin solution (Gibco, Life Technologies) and then incubated at 37°C , with 5% CO_2 and 95% hygrometry. For treatment, the medium was removed and replaced by $100\ \mu\text{L}$ of same medium containing $500\ \text{nM}$ of siRNAs to be tested. Each dose was repeated 6 times. The cells were incubated for 24 h before performing a MTT test as following. $10\ \mu\text{L}$ of $5\ \text{mg}/\text{mL}$ MTT (Sigma) in PBS buffer were added for 1 h at 37°C , 5% CO_2 and 95% hygrometry. The cells were lysed and formazan was solubilized by $100\ \mu\text{L}$ of 10% SDS and $10\ \text{mM}$ HCl solution overnight. Produced formazan was measured with a plate reader at $570\ \text{nm}$ (EL 808, BioTek). Results are expressed as the percentage of untreated cells.

4.9. Epi-fluorescence microscopy

For cell delivery measurement, 5×10^4 A673 cells were seeded on day before treatment in 12 wells-plate containing a glass cover slide in DMEM medium (Gibco, Life Technologies) containing 10% fetal calf serum (Gibco, Life Technologies) and 1% Penicillin, streptomycin solution (Gibco, Life Technologies) and then incubated at 37°C , with 5% CO_2 and 95% hygrometry. Medium was discarded and replaced by $500\ \mu\text{L}$ of $500\ \text{nM}$ Cy3-siRNA in DMEM medium containing 10% fetal

calf serum and 1% penicillin, streptomycin solution for 3 h or 24 h at 37 °C, 5% CO₂ and 95% hygrometry. The medium was discarded and the cells were gently washed with PBS and incubated in dark at room temperature with 4% formalin in PBS buffer. After three washes with PBS, cells were mounted on slide with DAPI fluoromount G (SouthernBiotech) before being observed with an epi-fluorescence microscope (Observer; Zeiss).

Acknowledgment

Florian Gauthier thanks the University of Montpellier, France for financial support.

A. Supplementary data

Supplementary material that may be helpful in the review process should be prepared and provided as a separate electronic file. That file can then be transformed into PDF format and submitted along with the manuscript and graphic files to the appropriate editorial office.

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.07.033>.

References

1. Haussecker D, Kay MA. *Science*. 2015;347:1069–1070.
2. Wittrup A, Lieberman J. *Nat Rev Genet*. 2015;16:543.
3. Deleavey GF, Damha MJ. *Chem Biol*. 2012;19:937–954.
4. Shukla S, Sumaria CS, Pradeepkumar PI. *ChemMedChem*. 2010;5:328–349.
5. Manoharan M, Akinc A, Pandey RK, et al. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50:2284–2288.
6. Prakash TP, Allerson CR, Dande P, et al. *J Med Chem*. 2005;48:4247–4253.
7. Martínez-Montero S, Deleavey GF, Martín-Pintado N, Fakhoury JF, González C, Damha MJ. *ACS Chem Biol*. 2015;10:2016–2023.
8. Debart F, Dupouy C, Vasseur JJ. *Beilstein J Org Chem*. 2018;14:436–469.
9. Lavergne T, Baraguey C, Dupouy C, et al. *J Org Chem*. 2011;76:5719–5731.
10. Martin AR, Lavergne T, Vasseur J-J, Debart F. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19:4046–4049.
11. Parey N, Baraguey C, Vasseur J-J, Debart F. *Org Lett*. 2006;8:3869–3872.
12. Biscans A, Bos M, Martin AR, et al. *ChemBioChem*. 2014;15:2674–2679.
13. Biscans A, Rouanet S, Bertrand J-R, Vasseur JJ, Dupouy C, Debart F. *Bioorg Med Chem*. 2015;23:5360–5368.
14. Biscans A, Bertrand J-R, Dubois J, et al. *ChemBioChem*. 2016;17:2054–2062.
15. Estrela JM, Ortega A, Obrador E. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006;43:143–181.
16. Ścibior D, Skrzycki M, Podsiad M, Czeczot H. *Clin Biochem*. 2008;41:852–858.
17. Ochi Y, Nakagawa O, Sakaguchi K, Wada S-I, Urata H. *Chem Commun*. 2013;49:7620–7622.
18. Ochi Y, Imai M, Nakagawa O, Hayashi J, Wada S-I, Urata H. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26:845–848.
19. Hayashi J, Nishigaki M, Ochi Y, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018;28:2171–2174.
20. Biscans A, Rouanet S, Vasseur JJ, Dupouy C, Debart F. *Org Biomol Chem*. 2016;14:7010–7017.
21. Bertrand J-R, Lucas C, Pham NM, et al. *Nucleic Acid Ther*. 2015;25:121–129.
22. Gauthier F, Beltran F, Biscans A, Debart F, Dupouy C, Vasseur J-J. *Org Biomol Chem*. 2018;16:3181–3188.
23. Lavergne T, Bertrand J-R, Vasseur J-J, Debart F. *Chem Eur J*. 2008;14:9135–9138.
24. Semenyuk A, Földesi A, Johansson T, et al. *J Am Chem Soc*. 2006;128:12356–12357.



Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 3181

A 2',2'-disulfide-bridged dinucleotide conformationally locks RNA hairpins†

Florian Gauthier, Frédéric Beltran, Annabelle Biscans, Françoise Debart,  Christelle Dupouy * and Jean-Jacques Vasseur 

The synthesis and the impact of a disulfide bridge between 2'-O-positions of two adjacent nucleotides in an RNA duplex and in the loop of RNA hairpins are reported. The incorporation of this 2',2'-disulfide (S–S) bridge enabled thermal and enzymatic stabilization of the hairpin depending on its position in the loop. The influence of the disulfide bridge on RNA folding was studied at the HIV Dimerization Initiation Site (DIS) as an RNA sequence model. We have shown that this S–S bridge locked the hairpin form, whereas the extended duplex form was generated after the reduction of the disulfide bond in the presence of tris (2-carboxyethyl)phosphine or glutathione. Thus, the S–S bridge can be useful for understanding RNA folding; an RNA molecular beacon locked by an S–S bridge was also investigated as a sensor for the detection of glutathione.

Received 7th February 2018,
Accepted 4th April 2018

DOI: 10.1039/c8ob00328a

rsc.li/obc

Introduction

Structured RNAs including RNA hairpins play critical roles in biology. RNA hairpins are the most common secondary structures found in nucleic acids, and especially in transfer RNA (tRNA). RNA hairpins participate in the recognition of messenger RNA (mRNA) during translation.^{1,2} They are also involved in riboswitches that control gene expression.^{3,4} Their remarkable structure consisting of a double-stranded RNA (stem) and a loop with unpaired nucleotides has attracted great interest for diverse applications. For example, synthetic RNA hairpins that mimic small interfering RNA (siRNA) and micro RNA (miRNA) precursor molecules can target a gene for silencing.⁵ They can also be used as aptamers for cancer diagnosis and therapy.⁶ However, the low enzymatic stability of natural RNA has limited the studies of RNA hairpins. Therefore, several chemical modifications have been introduced into RNA hairpins to enzymatically and thermally stabilize them in order to obtain a better understanding of their structure and behavior.^{7–9} Among these modifications, the functional thiol group plays a central role in the cross-linking of nucleic acids *via* a disulfide bond and there-

fore in the study of DNA and RNA folding into secondary and tertiary structures.^{10–16} For example, a disulfide bond was used to link the 3' and 5' ends of the stem of a hairpin through an aliphatic linker attached to either the nucleobases¹⁷ or the phosphate groups.¹⁸ Another approach consisted of replacing the phosphodiester bond by a diphosphoryl-disulfide linkage in the stem.^{18,19}

Several modifications have been introduced into the stem of an RNA hairpin, while the insertion of a disulfide (S–S) bridge into the loop part of an RNA hairpin for structural studies has not been reported to date. In this work, we investigated the effect of a disulfide bridge at different locations in the loop of an RNA hairpin with the aim of promoting the hairpin structure instead of the duplex form. To introduce the S–S bridge, we took advantage of a side reaction that we noticed in a previous work during a thiol disulfide exchange reaction on solid support between the 2'-positions of two adjacent 2'-O-acetylthiomethyl (2'-O-AcSM) nucleotides. Indeed, we developed a convenient method for the preparation of siRNAs 2'-O-modified by disulfide-containing groups.²⁰ The synthesis was based on a thiol disulfide exchange reaction on solid support between a 2'-O-AcSM containing RNA and an alkyl-disulfanylpiperidine derivative. An exception was highlighted when the existence of two adjacent 2'-O-AcSM nucleotides led to a dimethylene disulfide bond between the 2'-OH positions. Interestingly, another example of oligonucleotides with a disulfide linker between two neighboring thymidines within the same strand was reported to assess the effect of intrastrand locks on a hybridization probe.²¹ In this paper, we report on the synthesis of oligoribonucleotides (ONs) modified with one

IBMM, UMR 5247, Univ. Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France.

E-mail: christelle.dupouy@umontpellier.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthesis of cytidine, adenosine and guanosine phosphoramidite **1a–c** and modified sequences, NMR spectra of intermediate and phosphoramidite **1a–c**, analytical data of 2'-O-disulfide-bridged RNA sequences, T_m data and CD spectra of ONs, gel electrophoresis with SVPDE, fluorescence emission spectra with labelled ONs. See DOI: 10.1039/c8ob00328a

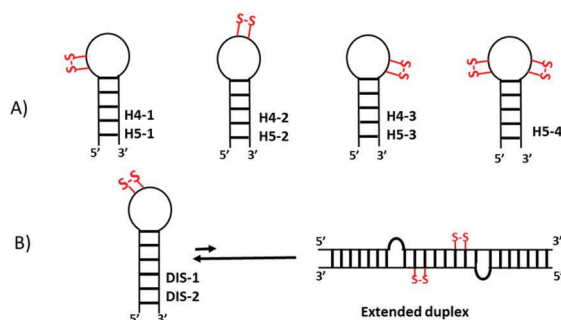


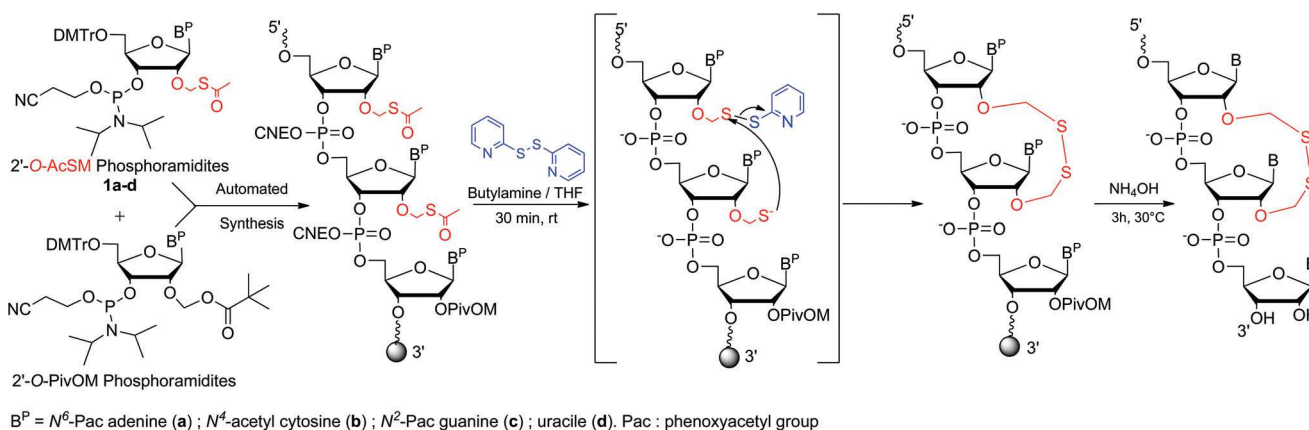
Fig. 1 (A) Hairpin models containing 4 (H4) or 5 (H5) uridines in the loop portion. The disulfide bridge was introduced at four different positions in the loop: at the 5' end (H4-1 and H5-1), in the middle (H4-2 and H5-2), at the 3' end (H4-3 and H5-3) and both extremities (H5-4). (B) Schematic drawing of the hairpin/extended duplex conversion for the HIV-1 Dimerization Initiation Site (DIS). The disulfide bridge on the loop of DIS-1 or DIS-2 promoted the structures in hairpin form.

or two 2',2'-disulfide bridges and on their influence on the thermal and enzymatic stabilities of several hairpins with diverse modifications in the loop. First, as a model, we chose two partially self-complementary RNA sequences **H4** and **H5** containing 4 or 5 uridines nucleotides in their loop part, respectively (Fig. 1A). These sequences have been previously used to study the effect of constrained dinucleotides on DNA hairpin stabilities.^{22,23} Then, the impact of the S-S bridge was studied on the hairpin *versus* RNA folding using a 23-nucleotide fragment of the HIV-1 Dimerization Initiation Site (DIS) as a model.^{24–26} The S-S bridge on the loop was demonstrated to prevent the formation of the extended duplex (Fig. 1B). After treatment with a reducing reagent such as tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) and glutathione (GSH), the DIS extended duplex was generated. Moreover, the use of this reducing-responsive RNA hairpin labeled at its 5' and 3' extremities with a dye and a fluorescence quencher, respectively, was investigated as a probe for the detection of GSH.

Results and discussion

Synthesis of oligoribonucleotides modified by a 2',2'-S-S bridge

The formation of the S-S bridge between two 2'-O-AcSM adjacent nucleotides results in an intramolecular thiol-disulfide exchange reaction between a thiolate generated from the thioester of a nucleotide upon a butylamine treatment and a pyridinedithiomethyl derivative formed with 2,2'-dithiopyridine on the adjacent nucleotide (Scheme 1). The preparation of these 2',2' disulfide bridges containing ONs required the use of 2'-O-AcSM cytidine, adenosine, uridine and guanosine phosphoramidites **1a–d**. The synthesis of uridine amidite **1d** was previously described,^{20,27} and the same synthetic route in 4 steps was followed in the present work to obtain other phosphoramidites **1a–c** with 26–39% overall yield from the 2'-O-methylthiomethyl-3',5'-O-(tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-*N*-acyl ribonucleosides (ESI, Scheme S1†). Modified ONs were synthesized on a standard succinyl-linker solid support with a DNA synthesizer using 2'-O-AcSM phosphoramidites **1a–d** and commercially available 2'-O-pivaloyloxymethyl (PivOM) ribonucleoside phosphoramidites as 2'OH precursors. The ON elongation was performed on a 1 μmol scale with a 180 s coupling step according to the RNA synthesis method previously developed by us (Scheme 1).²⁸ Following the assembly, the cyclization was performed with 20 equivalents of 2',2'-dithiopyridine in an anhydrous butylamine/THF (5 : 95) solution for 30 min. During this reaction, cyanoethyl groups were also removed. Then, an ammonia treatment removed the acyl protecting groups from the nucleobases, 2'-O-PivOM groups and released ON from the solid support. Crude ONs were purified by ion-exchange high-performance liquid chromatography (IEX-HPLC). The low yields (range from 1.4% to 7.0%) might be explained by the premature release of a part of the oligonucleotide from solid support during the butylamine treatment (Table 1). The presence of the S-S bridge was ascertained by MALDI-TOF mass spectrometry (Table 1 and ESI, Fig. S13–S23†). A difference of 90.5 was calculated between the *m/z* of



Scheme 1 Synthesis of oligoribonucleotides modified by a 2',2'-disulfide bridge.

Table 1 Sequences and thermal stability of oligoribonucleotides

ON	RNA sequences ^a	% ON ^b	MALDI-TOF MS ^c		Isolated material ^d (nmol)	T_m ^e (°C)	ΔT_m ^e (°C)
			Calcd.	Found			
S1	5'-GCCUUCUsUsAUGAUU-3'	42	4434.8	4430.9	19	—	—
H4	5'-AUCCUAUUUUUAGGAU-3'	—	5004.0	5003.7	—	63.6	—
H4-1	5'-AUCCUAUUsUsUUUAGGAU-3'	54	5094.2	5095.4	59.7	64.2	+ 0.6
H4-2	5'-AUCCUAUUsUsUUAGGAU-3'	54	5094.2	5095.9	36	66.3	+ 2.7
H4-3	5'-AUCCUAUUUUsUsUAGGAU-3'	39	5094.2	5095.9	55.1	59.7	-3.9
H5	5'-AUCCUAUUUUUUAGGAU-3'	—	5310.2	5311.6	—	62.4	—
H5-1	5'-AUCCUAUUsUsUUUUAGGAU-3'	41	5400.3	5402.1	30.2	31.2/62.5	—
H5-2	5'-AUCCUAUUUUsUsUUAGGAU-3''	41	5400.3	5401.7	70.4	62.4	0
H5-3	5'-AUCCUAUUUUsUsUAGGAU-3'	42	5400.3	5401.2	47.3	58.5	-3.9
H5-4	5'-AUCCUAUUsUsUUUsUAGGAU-3'	28	5490.5	5491.2	20.7	n.d.	n.d.
DIS	5'-CUUGCUGAGGUGCACACAGCAAG-3'	—	7384.5	7386.2	—	65.4	—
DIS-1	5'-CUUGCUGAGGUsGsCACACAGCAAG-3'	28	7474.7	7476.9	14	37.7/70.4	—
DIS-2	5'-CUUGCUGAGGUGCsAsCACACAGCAAG-3'	31	7474.7	7477.1	25.6	35.9/69.8	—
DIS-F	5'-FAM-CUUGCUGAGGUGCACACAGCAAG-DABCYL-3'	—	8383.4	8383.8	—	—	—
DIS-2F	5'-FAM-CUUGCUGAGGUGCsAsCACACAGCAAG-DABCYL-3'	55	8476.4	8476.5	21.5	—	—

^a G, C, A, U = 2'-OH nucleosides. Gs, Cs, As, Us = 2',2'-S-S bridge nucleotides in bold, nucleotides forming the stem of the hairpin are shown underlined. ^b Relative percentage of peak area corresponding to the 2',2'-disulfide ONs in the crude material, as calculated by integration of the IEX-HPLC chromatogram monitored at 260 nm. ^c Negative mode. ^d Amount of ONs after purification by IEX-HPLC, determined by UV measurement at 260 nm. ^e T_m values obtained from UV melting curves at 260 nm with 1.5 μ M strand concentration in 10 mM sodium cacodylate, 100 mM NaCl, pH 7 for **H4** and **H5**; 20 mM sodium cacodylate, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7 for **DIS**. Data are averages of two hybridization/melting cycles. Estimated errors in $T_m = \pm 0.5$ °C. n.d. = not determined.

each modified ON and the m/z of the corresponding unmodified ON, and this was assigned to the CH₂-S-S-CH₂ bond.

Thermal denaturation and gel electrophoresis studies

Thermal stability of RNA/RNA and RNA/DNA duplexes containing a 2',2'-S-S-bridged dinucleotide in the RNA strand. Using UV melting experiments at 260 nm, we evaluated the impact of a 2',2'-S-S bridge between two neighboring uridine residues located in the middle of a 14-nucleotide long RNA **S1** on the thermal stability of duplexes formed with its complementary RNA or DNA target (Table 2, ESI Fig. S24†).^{22,23} For both modified RNA-RNA (**D2**) and RNA-DNA (**D4**) duplexes, the 2',2'-S-S bridge induced a strong destabilization (ΔT_m from -11.6 °C for **D2** to -13.5 °C for **D4**) in comparison with the corresponding unmodified duplexes **D1** and **D3**, and we therefore decided to investigate the effect of its introduction into a non-base-pairing region of the RNA hairpins.

Table 2 Thermal stability of duplexes

No.	Duplex ^a	T_m ^b (°C)	ΔT_m ^b (°C)
D1	5'-GCCUUCUUAUGAUU-3' 3'-CGGAAGAAUACUAA-5'	56.4	—
D2	5'-GCCUUCUsUsAUGAUU-3' 3'-CGGAAGAAUACUAA-5'	44.8	-11.6
D3	5'-GCCUUCUUAUGAUU-3' 3'-d(CGGAGAATACTAA)-5'	37.2	—
D4	5'-GCCUUCUsUsAUGAUU-3' 3'-d(CGGAGAATACTAA)-5'	23.7	-13.5

^a Us = 2',2'-S-S bridge nucleotides in bold. ^b T_m values obtained from UV melting curves at 260 nm with 1.5 μ M strand concentration in 10 mM sodium cacodylate, 100 mM NaCl, pH 7. Data are averages of two hybridization/melting cycles. Estimated errors in $T_m = \pm 0.5$ °C.

Thermal stability of 2',2'-disulfide-modified H4 and H5 hairpins. First, we used gel electrophoresis analysis to confirm that the unmodified ONs **H4** and **H5** existed exclusively in the hairpin form (ESI, Fig. S32†).²³ Thus, the unique transition observed in the melting curves for **H4** (ESI, Fig. S25†) and **H5** (ESI, Fig. S26†) corresponds to the hairpin denaturation (T_m of 63.6 °C and 62.4 °C, respectively). Several modified hairpins **H4** and **H5** were prepared with the S-S bridge at different positions in the loop: at the 5' end (**H4-1** and **H5-1**), in the middle (**H4-2** and **H5-2**), at the 3' end (**H4-3** and **H5-3**), and at both extremities of the loop for **H5** (**H5-4**) (Table 1). Compared to that of the unmodified hairpin **H4**, the S-S bridge caused a destabilization when it was located at the 3' end of the loop for **H4-3** ($\Delta T_m = -3.9$ °C). By contrast, when the modification was located at the 5' end of **H4-1**, no destabilization was observed. Finally, the S-S bridge in the center of the loop of **H4-2** induced a better stability than that of the unmodified hairpin **H4** ($\Delta T_m = + 2.7$ °C). For the hairpin **H5**, the S-S bridge at the extremities of the loop strongly disordered the structure of the hairpin. For **H4-3**, the S-S bridge at the 3' end of **H5-3** resulted in a decrease in the T_m value ($\Delta T_m = -3.9$ °C) compared to that of the unmodified hairpin **H5**. A melting curve with two transitions (31.2 and 62.5 °C) was observed for **H5-1** (ESI, Fig. S26†). When two S-S bridges were introduced at both extremities of the loop for **H5-4**, the shape of the curve was not a sigmoid, indicating a lack of cooperativity. These results showed that the S-S bridges at these positions hamper the base-pairing of the stem and, consequently, the formation of the hairpin. Gel electrophoresis analysis confirmed these results by indicating that different unidentified species are in equilibrium for **H5-1** and **H5-4** (ESI, Fig. S31†). Interestingly, the melting curve of **H5-2** was superimposable on that of **H5**,

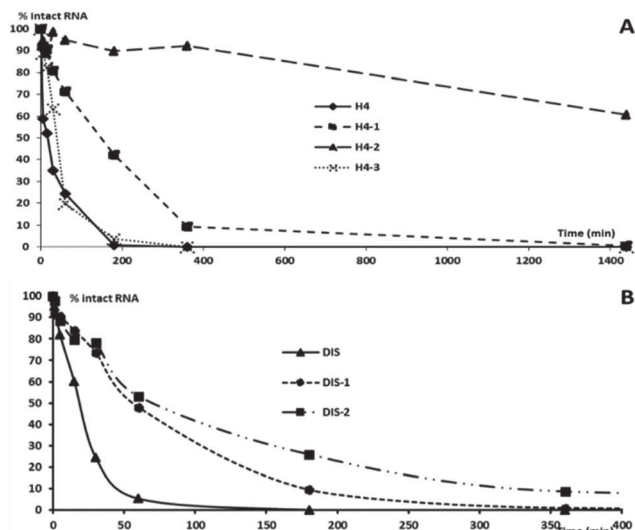


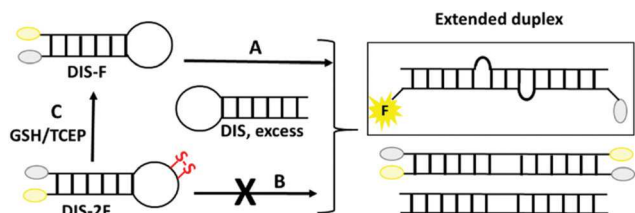
Fig. 4 Enzymatic stability of unmodified and modified H4 (A) and DIS (B) ONs against SVPDE.

Application as a molecular beacon

To strengthen the data obtained by gel electrophoresis and UV experiments, we used the molecular beacon strategy. The stems of **DIS** and modified **DIS-2** were covalently linked to a fluorophore (Fluorescein (FAM)) at the 5' end and a quencher at the 3' end (DABCYL) (Table 1).

When the molecular beacon is in the loop shape, the quencher and the fluorophore are close to each other, resulting in the quenching of fluorescence. The labeled unmodified **DIS-F** was mixed with the unlabeled **DIS** to spatially separate the two dyes by forming the extended duplex and to restore the fluorescence signal. Two other non-fluorescent extended duplexes corresponding to either the pairing of two **DIS-F** or two **DIS** strands could also be obtained (Scheme 2, route A).

The fluorescence was quenched for the labeled **DIS-2F** because the S-S bridge prevented the formation of the extended duplex (Scheme 2, route B). Upon use of a reducing reagent (TCEP or GSH), the S-S bridge was cleaved, thereby restoring the fluorescence signal (Scheme 2, route C). Measurements were performed with various ratios of unmodi-



Scheme 2 Schematic drawing of the molecular beacon **DIS-F** and **DIS-2F** with excess of unlabeled **DIS**. Route A: extended duplexes were formed, and fluorescence was restored. Route B: with the disulfide bridge, the hairpin form was locked. Route C: by adding TCEP or GSH, the S-S bridge was reduced, and the fluorescence signal was recovered.

fied **DIS** (1:1, 2:1, 5:1 and 10:1). The reaction was monitored by tracing the emission of the fluorescence of the resulting extended duplex (Fig. 5).

The fluorescence intensity of **DIS-F** slightly and gradually increased with increasing amount of unlabeled **DIS** (Fig. 5A). This modest increase may be explained as due to the fluorescence signal not being fully restored because of the presence of other extended duplexes (Scheme 2). Only the extended duplex consisting of **DIS-F** and **DIS** resulted in fluorescence emission. However, no change of fluorescence was observed for **DIS-2F** (Fig. 5B). In this case, the molecular beacon was inactive, and the stem could not be opened even in the presence of excess **DIS**. In agreement with the gel experiment data, the S-S bridge locked the structure into the hairpin conformation. After TCEP treatment of **DIS-2F**, the molecular beacon was activated, leading to an enhancement of the fluorescence emission (Fig. 5C and D). These results confirm that the S-S bridge strongly disrupts the hairpin/duplex equilibrium by constraining the sequence to its hairpin form. Incorporation of the S-S bridge in the loop of **DIS** allowed us not only to study the folding of the HIV-DIS system but also to develop a tool for the detection of GSH.

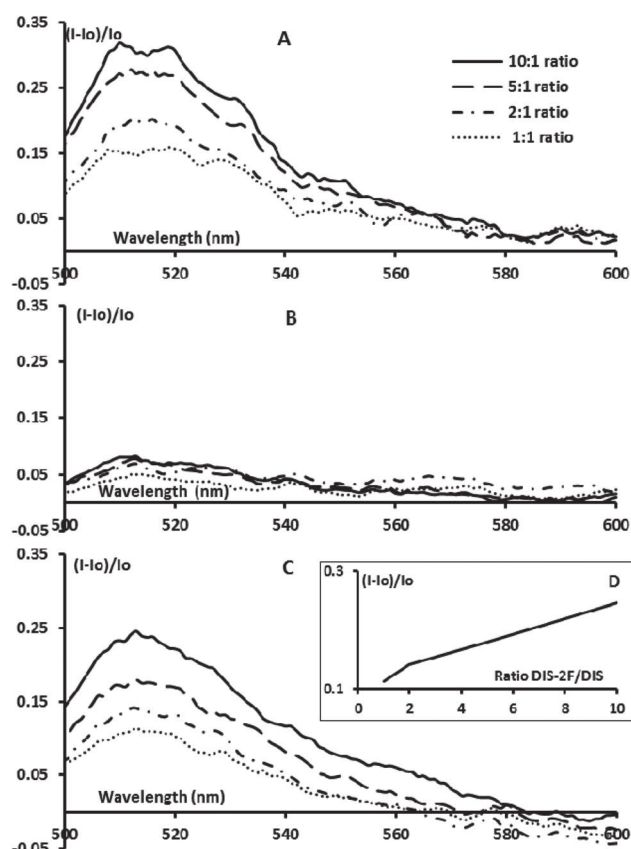


Fig. 5 Relative fluorescence curves ($(I-I_0)/I_0$) of **DIS-F** (A), **DIS-2F** (B) and **DIS-2F** in the presence of TCEP (C) with various ratio of **DIS** (1:1, 2:1, 5:1 and 10:1). (D) Fluorescence curves ($(I-I_0)/I_0$) of **DIS-2F** with various ratios of **DIS** at the wavelength of maximum of fluorescence emission ($\lambda = 515$ nm).

Detection of glutathione

GSH plays an important role as an anti-oxidant reagent under normal physiological conditions by preventing cell damage caused by reactive oxygen species.²⁹ Moreover, intracellular concentration of GSH is higher in some cancer cells than in the corresponding normal cells.³⁰ Detection of GSH is highly challenging, and to our knowledge, only two examples of FRET-based DNA molecular beacon have been reported to date.^{31,32}

DIS-2F was treated with several concentrations of GSH in the range from 100 nM to 1 mM. The fluorescence intensity gradually increased with increasing GSH concentration (ESI Fig. S35†). As reported previously, the limit of detection (LOD) was determined with three trials.³³ The fluorescence emission at the wavelength of maximum intensity ($\lambda = 515$ nm) was traced as a function of the glutathione concentration (ESI Fig. S36A†). The LOD was calculated for the response linearity in the range from 1 to 100 μ M (ESI Fig. S36B†). Experimental data were fitted using the least-squares (LSQ) method.³² From these data, the LOD of 20 μ M was obtained based on the equation: $[\text{LOD}] = (3 \times \text{standard deviation})/\text{slope}$.

Our system has less sensitivity than that of the disulfide bound molecular beacon previously reported by Qu *et al.*, which can detect GSH in the nanomolar range.³¹ However, since the intracellular concentration GSH concentration is in the millimolar range, our disulfide-locked molecular beacon may be envisaged as a probe for the detection of GSH.

Conclusion

In conclusion, we reported an original 2',2'-S-S bridge modification between the 2'-O-positions of two neighboring nucleotides. Its introduction into a canonical RNA duplex showed a significant thermal destabilization. By contrast, when introduced in the middle of the loop of a hairpin, the S-S bridge increased both the thermal and enzymatic stabilities. The study of the hairpin/duplex equilibrium of the **DIS** sequence showed that the S-S bridge locked the hairpin conformation and consequently hampered the dimerization and the formation of the extended duplex. The cleavage of the S-S link obtained by the addition of a reducing reagent led to the recovery of the folding of unmodified **DIS**. An application as a molecular beacon was demonstrated, confirming these results. This S-S bridge between two nucleotides in a loop part of an RNA hairpin is promising with a double advantage: it can be useful as a tool to study the folding of an RNA hairpin involved in different biological processes and as a probe for GSH detection.

Experimental section

General

Analytical and semi-preparative HPLC were performed on a Dionex DX 600 HPLC system equipped with anion-exchange

DNAPac PA 100 columns (4×250 mm for analysis or 9×250 mm, Dionex). The following HPLC solvent systems were used: 5 or 20% CH_3CN in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8 (buffer A) and 20% CH_3CN containing 200 mM NaClO_4 in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8 or 5% CH_3CN containing 400 mM NaClO_4 in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8 (buffer B). Flow rates were 1.0 mL min^{-1} and 4 mL min^{-1} for analysis and semi-preparative purposes, respectively; UV detection was performed at 260 nm. MALDI-TOF mass spectra were recorded using a Voyager-DE spectrometer equipped with an N_2 laser (337 nm) (PerSeptive Biosystems, USA) or an Axima Assurance spectrometer equipped with an N_2 laser (337 nm) (Shimadzu Biotech) using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as a saturated solution in a mixture of acetonitrile/0.1 M ammonium citrate solution (1 : 1, v/v) for the matrix. Analytical samples were mixed with the matrix in the 1 : 5 (v/v) ratio, crystallized on a 100-well or 384-well stainless-steel plate and analyzed. UV quantitation of RNAs was performed using a Varian Cary 300 Bio UV/Visible spectrometer by measuring the absorbance at 260 nm.

Solid-phase synthesis of 2'-O-AcSM modified ONs. RNA sequences were synthesized using an ABI model 394 DNA/RNA synthesizer on a 1 μ mol scale using commercial 2'-O-PivOM phosphoramidites (Chemgenes) or 2'-O-AcSM phosphoramidites **1a-d** and a long chain alkylamine (LCAA) controlled-pore glass (CPG) as solid support through a succinyl linker. Oligonucleotides were assembled in a TWISTTM synthesis columns (Glen Research). Labeled **DIS-F** and **DIS-2F** ONs were synthesized using 5'-fluorescein-CE-phosphoramidite (6-FAM) and 3'-DABCYL CPG as solid support (Link Technologies). Phosphoramidites were vacuum-dried prior to their dissolution in extra-dry acetonitrile (Biosolve) at 0.1 M concentration. Coupling for 180 s was performed with 5-benzylmercaptotetrazole (BMT, 0.3 M) as the activator. The oxidizing solution was 0.1 M iodine in THF/pyridine/ H_2O (78 : 20 : 2; v/v/v) (Link Technologies). The capping step was performed with a mixture of 5% phenoxyacetic anhydride (PAC_2O) in THF and 10% N-methylimidazole in THF (Link Technologies). Detritylation was performed with 3% TCA in CH_2Cl_2 . After RNA assembly completion, the column was removed from the synthesizer and dried under a stream of argon.

Synthesis of 2',2'-disulfide-bridged oligoribonucleotides. After ON elongation, the solid support inside the TWISTTM column was treated with 2 mL of dithiodipyridine (20 equiv.) in anhydrous THF/ BuNH_2 (95 : 5 solution). The solution was applied to the synthesis column using two glass syringes filled with 4 Å molecular sieves (5 beads each) and was pushed back and forth through the synthesis column for 30 min. Then, the solution was removed, and the solid support was washed with anhydrous THF followed by a 1 min flush with argon. Finally, the solid support was treated with a 30% aqueous ammonia solution for 3 h at 25 °C. The deprotection solution was evaporated in the presence of isopropylamine (13% of total volume) under reduced pressure.²⁸ The residue was dissolved in 1.5 mL of water, transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized.

Analysis, purification and desalting. The crude ONs were analyzed by IEX-HPLC using a specific linear gradient of

buffer B in buffer A for each ON and were then characterized by MALDI-TOF spectrometry. The crude mixtures were purified by semi-preparative IEX-HPLC with a specific linear gradient of buffer B in buffer A. The pure fractions of each ON were pooled in a 100 mL round-bottomed flask and were concentrated to dryness under reduced pressure. The residues were dissolved in 100 mM TEAAc buffer, pH 7 (8 mL divided in three portions for flask rinse: 5 mL, 2 mL, 1 mL) and were loaded on a C₁₈ cartridge (Waters, Sep-Pak®). Elution was performed with 10 mL of a 100 mM TEAAc solution and then with 10 mL of 50% CH₃CN in a 12.5 mM TEAAc solution. The second fraction containing the desired ON was collected in a 50 mL round-bottomed flask and was lyophilized. The residue was dissolved in 1.5 mL of water (divided in 3 portions of 0.8 mL, 0.4 mL, and 0.3 mL for flask rinsing) and transferred to a 2 mL Eppendorf-vial and lyophilized from water. Purified ONs were analyzed by MALDI-TOF MS and were quantified by UV measurement. Lyophilized RNAs were stored at -20 °C for several months without any degradation.

Thermal denaturation experiments. T_m experiments were performed using a CARY 300 UV Spectrophotometer (Varian Inc.) equipped with a Peltier temperature controller and thermal analysis software. The samples were prepared by mixing ON solutions to give 1.5 μM final concentrations in 1 mL of buffer (10 mM Na cacodylate, 100 mM NaCl, pH 7 for H4 and H5 hairpins, 20 mM Na cacodylate, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7 for DIS) in a 1 cm path length quartz cell. A heating-cooling-heating cycle in the 0–90 °C temperature range with a 0.5 °C min⁻¹ gradient was applied. T_m values were determined from the maxima of the first derivative plots of the absorbance versus temperature. The T_m values from two independent experiments were accurate within ±0.5 °C. The solutions were stored in 2 mL Eppendorf-vials at -80 °C.

Gel electrophoresis experiments. 80 μM DIS solutions were prepared in deionized water. For each RNA, aliquots were withdrawn, lyophilized and redissolved in 25 mM KCl, 2 mM MgCl₂, and 25 mM Na-cacodylate pH 7 (20 μL) to obtain 5 μM solutions. All samples were denatured by heating at 90 °C for 3–5 min followed by cooling to room temperature overnight; the samples were then kept at 4 °C for 3 h and diluted with formamide (20 μL). Each sample was analyzed by gel electrophoresis (15% polyacrylamide, Tris borate MgCl₂ (TBM) buffer 1×, 37 °C). The gels were stained with GelRed 3× (VWR) in a 0.1 M NaCl solution for 1 h and revealed using a UV transilluminator.

CD spectroscopy studies. CD spectra were recorded on a Jasco J-815 spectropolarimeter. The solutions used for T_m experiments were transferred into a 1 cm path length quartz cell. Measurements were performed at 1 °C with the wavelength range set to 340–200 nm and a scanning speed of 100 nm min⁻¹. Raw data were acquired over 2 scans.

SVPDE stability assay. The stability of ONs was evaluated by gel electrophoresis. ONs solutions (2.4 nmol, $C = 77 \mu\text{M}$, $V = 31.1 \mu\text{L}$) were diluted with an ammonium citrate solution (450 mM, 8.9 μL) and incubated with snake venom phosphodiesterase (2 mU, 10 μL) at 37 °C. At different incubation times, aliquots (3 μL) were withdrawn, immediately frozen and stored

at -80 °C until analysis. Each sample was then analyzed by gel electrophoresis (15% polyacrylamide, 4 °C, TBE buffer). The gels were stained with GelRed 3× (VWR) in a 0.1 M NaCl solution for 1 h and revealed using a UV transilluminator. Band analysis was performed using the ImageJ Software (Broken Symmetry Software V:1.4.3.67). Half-lives were determined by the hypothesis of first-order kinetics, and the calculations were performed on Microsoft Office Excel with an exponential trend line given by $y(t) = Ae^{(-kt)}$ ($0.95 \leq R^2 \leq 1.00$).

Fluorescence measurements. Fluorescence emission spectra were recorded using a Jasco J-815 spectropolarimeter at 25 °C from 400 to 600 nm, with the excitation wavelength of 494 nm in a 100 μL quartz cell with a 1 cm light path. Raw data were acquired over 2 scans. For TCEP experiments, a 100 μM DIS-2F solution was prepared in deionized water. A 4 μM DIS-2F solution was prepared from this DIS-2F solution (20 μL) in the buffer (480 μL, 20 mM sodium cacodylate, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7). This DIS-2F solution (50 μL) was mixed with DIS solutions (50 μL) at different concentrations in the buffer (4 μM/8 μM/20 μM/40 μM) to obtain a 2 μM DIS-F solution used for analyses. The buffered DIS-2F solution (50 μL) was also mixed with the buffer (50 μL) to be used as a reference (I_0). These solutions were then denatured by heating at 90 °C for 3 min followed by slow cooling to 37 °C overnight. The DIS to DIS-2F ratios ranged from 1 to 10, corresponding to the non-labeled RNA concentration from 2 to 20 μM in the final solution. After analysis, 2 μL of a 50 mM TCEP solution were added to all solutions (including I_0). The solutions were left for 2 minutes in the presence of TCEP at room temperature before denaturation by heating at 90 °C for 3 min followed by cooling to 37 °C for 2 h.

For glutathione experiments, 100 μM DIS-2F and 105 μM DIS solutions were prepared in deionized water. DIS-2F solution (2 μL) was mixed with DIS solution (19 μL) and glutathione-free buffer (79 μL, 20 mM sodium cacodylate, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7) to be used as the reference. DIS-2F solution (2 μL) was mixed with DIS solution (19 μL) and glutathione buffer (79 μL, 20 mM sodium cacodylate, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 127 nM/1.27 μM/12.7 μM/127 μM/1.27 mM glutathione, pH 7) to obtain the final glutathione solutions of 100 nM/1 μM/10 μM/30 μM/60 μM/100 μM/1 mM. All solutions were prepared in triplicate. These solutions were left for 5 min at room temperature before heating at 90 °C for 5 min followed by slow cooling to 25 °C overnight prior to the analysis.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

Florian Gauthier and Annabelle Biscans thank the University of Montpellier for financial support.

Notes and references

- 1 R. T. Batey, R. P. Rambo and J. A. Doudna, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1999, **38**, 2326–2343.
- 2 P. Svoboda and A. D. Cara, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006, **63**, 901–908.
- 3 S. DebRoy, M. Gebbie, A. Ramesh, J. R. Goodson, M. R. Cruz, A. van Hoof, W. C. Winkler and D. A. Garsin, *Science*, 2014, **345**, 937–940.
- 4 A. Serganov and E. Nudler, *Cell*, 2013, **152**, 17–24.
- 5 M. T. McManus, C. P. Petersen, B. B. Haines, J. Chen and P. A. Sharp, *RNA*, 2002, **8**, 842–850.
- 6 S.-i. Hori, A. Herrera, J. Rossi and J. Zhou, *Cancers*, 2018, **10**, 9–33.
- 7 W. Pils and R. Micura, *Nucleic Acids Res.*, 2000, **28**, 1859–1863.
- 8 A. H. El-Sagheer and T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 15329–15334.
- 9 A. Kiliszek, L. Błaszczuk, R. Kierzek and W. Rypniewski, *Nucleic Acids Res.*, 2017, **45**, e92–e92.
- 10 S. E. Osborne, J. Völker, S. Y. Stevens, K. J. Breslauer and G. D. Glick, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 11993–12003.
- 11 M. Endo and T. Majima, *Chem. Commun.*, 2004, **11**, 1308–1309.
- 12 A. A. Gorodetsky and J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 6074–6075.
- 13 S. Alefelder and S. T. Sigurdsson, *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, **8**, 269–273.
- 14 D. Li, X. Wang, F. Shi, R. Sha, N. C. Seeman and J. W. Canary, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 8823–8827.
- 15 M. De Stefano and K. V. Gothelf, *ChemBioChem*, 2016, **17**, 1122–1126.
- 16 T. L. Trinh, G. Zhu, X. Xiao, W. Puszyk, K. Sefah, Q. Wu, W. Tan and C. Liu, *PLoS One*, 2015, **10**, e0136673.
- 17 G. D. Glick, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 6746–6747.
- 18 N. Dolinnaya, V. Metelev, T. Oretskaya, D. Tabatadze and Z. Shabarova, *FEBS Lett.*, 1999, **444**, 285–290.
- 19 D. Lesage, V. Metelev, O. Borisova, N. Dolinnaya, T. Oretskaya, F. Baran-Marszak, E. Taillandier, M. Raphael and R. Fagard, *FEBS Lett.*, 2003, **547**, 115–118.
- 20 A. Biscans, S. Rouanet, J.-J. Vasseur, C. Dupouy and F. Debart, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 7010–7017.
- 21 C. Prestinari and C. Richert, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 10824–10826.
- 22 C. W. Hilbers, C. A. G. Haasnoot, S. H. de Bruin, J. J. M. Joordens, G. A. Van der Marel and J. H. Van Boom, *Biochimie*, 1985, **67**, 685–695.
- 23 C. Dupouy, P. Millard, A. Boissonnet and J.-M. Escudier, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 5142–5144.
- 24 S. Bernacchi, E. Ennifar, K. Tóth, P. Walter, J. Langowski and P. Dumas, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 40112–40121.
- 25 D. Muriaux, P. Fossé and J. Paoletti, *Biochemistry*, 1996, **35**, 5075–5082.
- 26 E. Ennifar, S. Bernacchi, P. Wolff and P. Dumas, *RNA*, 2007, **13**, 1445–1452.
- 27 N. Parey, C. Baraguey, J.-J. Vasseur and F. Debart, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 3869–3872.
- 28 T. Lavergne, J.-R. Bertrand, J.-J. Vasseur and F. Debart, *Chem. – Eur. J.*, 2008, **14**, 9135–9138.
- 29 M. H. Lee, Z. Yang, C. W. Lim, Y. H. Lee, S. Dongbang, C. Kang and J. S. Kim, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 5071–5109.
- 30 R. R. Perry, J. Mazetta, M. Levin and S. C. Barranco, *Cancer*, 1993, **72**, 783–787.
- 31 Y. Guo, H. Wang, Y. Sun and B. Qu, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 3221–3223.
- 32 H. Xu and M. Hepel, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 813–819.
- 33 D. A. Armbruster and T. Pry, *Clin. Biochem. Rev.*, 2008, **29**, S49–S52.

Auteur : Florian Gauthier

Année : 2018

Titre : Synthèse et propriétés d'ARNs modifiés en position 2' *via* des ponts disulfures

Résumé : Les ARNs sont impliqués dans de nombreux processus biologiques et peuvent adopter des structures secondaires différentes. Par leurs propriétés, ils constituent des outils biologiques puissants pour des applications diverses, tels les ARNs interférents (siARN) qui permettent l'extinction de l'expression des gènes par exemple. L'introduction de modifications sur des ARNs s'est avérée essentielle pour améliorer leurs propriétés et faciliter l'étude de leurs rôles biologiques et leurs applications thérapeutiques.

Ce manuscrit rapporte la synthèse et les propriétés d'ARNs modifiés en position 2' du ribose par des groupements contenant des ponts disulfures, sensibles à un environnement réducteur.

Dans la première partie, la synthèse de prodrogues de siARNs partiellement modifiés par des groupements benzyldithiométhyles est décrite. Leurs stabilités thermiques et enzymatiques, ainsi que leur démasquage en milieu réducteur, sont montrés. Les résultats prometteurs d'activité inhibitrice et de pénétration cellulaire, sur une lignée cellulaire du sarcome d'Ewing, permettent d'envisager une application potentielle de ces siARNs modifiés comme outils thérapeutiques.

La deuxième partie décrit une approche de co-délivrance par des siARNs couplés avec une drogue anticancéreuse, la doxorubicine, *via* un lien auto-immolable contenant des ponts disulfures. Les propriétés physico-chimiques des conjugués sont déterminées, et la libération du siARN et de la drogue en milieu réducteur est mise en évidence.

La troisième partie présente une autre méthode de conjugaison en solution entre la position 2' d'un ARN et des petites molécules (sucres, coumarine, biotine, acide désoxycholique, glutathion) *via* un pont disulfure. La synthèse des ARNs conjugués et leur devenir en milieu réducteur sont décrits.

Dans la dernière partie, l'impact d'un lien avec un pont disulfure intrabrin entre les positions 2' de deux nucléotides adjacents est étudié dans un duplex ou la partie boucle d'hairpins. L'influence du pont disulfure sur l'équilibre des conformations duplex et hairpin d'un ARN d'intérêt biologique est évaluée, en absence et en présence d'agents réducteurs. Une application en fluorescence d'une hairpin contrainte en tant que « molecular beacon » montre des utilisations potentielles de ce lien dans des outils pour étudier la conformation de structures secondaires d'ARNs ou dans des sondes pour détecter les agents réducteurs.

Mots clés : oligoribonucléotides, prodrogues de siARN, ponts disulfures, conjugaison, liens auto-immolables, hairpin.

Title: Synthesis and properties of 2'-O-modified RNAs bearing disulfide-containing groups

Summary: RNAs are involved in numerous biological processes and can adopt different secondary structures. Thanks to their properties, they are powerful biological tools for diverse applications, such as small interfering RNA (siRNA) for gene silencing. Modified RNAs have proven to be essential to improve their properties, and to facilitate the study of their biological and therapeutic functions.

This manuscript reports the synthesis and properties of 2'-O-modified RNAs bearing disulfide-containing groups, sensitive to reductive environment.

The first part describes the synthesis of siRNAs prodrugs bearing lipophilic benzyldithiomethyl groups. The thermal stability, the serum stability and the response to glutathione treatment of modified siRNAs are thoroughly investigated. The gene silencing and the gymnotic delivery of several siRNAs are assessed, and demonstrates promising results on Ewing's sarcoma cell line.

A second part concerns the co-delivery of siRNAs and a hydrophobic anti-cancer drug (doxorubicin) using a self-immolative spacer bearing disulfide bonds. The chemico-physical properties of these conjugates are determined and the recovery of native siRNA and doxorubicin in response to reductive treatment is highlighted.

A third part presents the conjugation of RNAs to small molecules (sugars, coumarin, biotin, deoxycholic acid, glutathione) using disulfide linkages. The synthesis of the RNA conjugates and their release in reducing conditions are also demonstrated.

The last part reports the synthesis and the impact of an intrastrand dimethylene disulfide bridge between 2'-O-positions of two adjacent nucleotides in an RNA duplex and in the loop of RNA hairpins. Then, the influence of this linkage on the folding of a biologically relevant RNA structure is reported. Finally, an application of a constrained hairpin as a fluorescent molecular beacon highlights its potential use in tools for understanding RNA folding and in probes for the detection of reducing reagents.

Keywords: oligoribonucleotides, siRNA prodrug, disulfide bridge, conjugation, self-immolative linker, hairpin.

Lieu : Institut des biomolécules Max Mousseron, Equipe « Oligonucléotides modifiés », UMR 5247 CNRS-UM-ENSCM, Université Montpellier, Campus Triolet, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier, France