

Les oligonucléotides synthétiques "antisens"

(1^{re} partie)

Alfredo CRAVADOR*

Introduction.

Le sujet que nous abordons aujourd'hui est une illustration de l'évolution des approches chimiques qui visent à obtenir des molécules ayant des effets biologiques (par exemple dans la recherche de nouveaux médicaments), ou qui fonctionnent comme sondes (par exemple dans le diagnostic médical).

Les médicaments cytotoxiques exploitent des différences quantitatives biochimiques et cinétiques entre les cellules malades ou pathogènes et les cellules saines. Une thérapie plus efficace serait sans doute celle qui est basée sur un principe capable de distinguer les différences qualitatives entre cellules normales et cellules malades, en éradicant correctement et sélectivement les cellules défectueuses ou atteintes. Cette thérapie devrait répondre au rêve des chercheurs dans le domaine du médicament, qui ont toujours essayé de trouver des molécules capables d'atteindre la cible avec la précision d'un "tir magique".

Les oligonucléotides "antisens" sont des agents thérapeutiques potentiellement capables de répondre à ces critères, constituant à ce titre un nouveau principe thérapeutique.

Le principe d'action.

Le principe d'action sur lequel se base l'approche "antisens" est celui qui préside à de nombreux processus biologiques fondamentaux et dont les fondements ont été posés, il y a quatre décennies, par Watson et Crick en découvrant la structure de la molécule support universel de l'information génétique, la molécule de l'ADN.

L'ADN est constitué par deux chaînes poly-désoxyribonucléotidiques qui se maintiennent associées en double hélice grâce à des interactions extrêmement spécifiques entre les bases hétérocycliques, dites complémentaires, des nucléotides qui constituent les chaînes. Ces interactions sont les liaisons hydrogène, qui associent les bases cytosine (C) d'une chaîne aux bases guanine (G) de la chaîne complémentaire (3 liaisons hydrogène), et les bases thymine (T) aux bases adénine (A) (2 liaisons hydrogène). Les deux chaînes sont associées en sens opposé (fig. 1). Cette orientation, dite antiparallèle, est celle qui assure la stabilité optimale de la double hélice. Elle est définie par la position du groupe hydroxyle (5' ou 3')

ribosique qui participe à la liaison phosphodiester internucléotidique entre les riboses consécutifs.

Ainsi, la séquence nucléotidique suivante de désoxyribonucléotides orientée de droite à gauche dans le sens 5' → 3', 5'...TACTGCATCG...3' s'associera avec la séquence complémentaire 3'...ATGACGTAGC...5', orientée dans le sens 3' → 5', formant un hybride parfait. L'ARN, qui en général est constitué par une seule chaîne de ribonucléotides possède des propriétés semblables. Il donne lieu à des associations stables, formées avec des chaînes d'ADN ou d'ARN, ayant des séquences de bases hétérocycliques complémentaires et orientées en sens antiparallèle. Dans l'ARN l'uracile (U) qui remplace la thymine (T) de l'ADN, s'apparie avec l'adénine (A).

Les molécules d'ADN et d'ARN sont composées de milliers de nucléotides, qui diffèrent uniquement par leur séquence et leur composition en bases hétérocycliques.

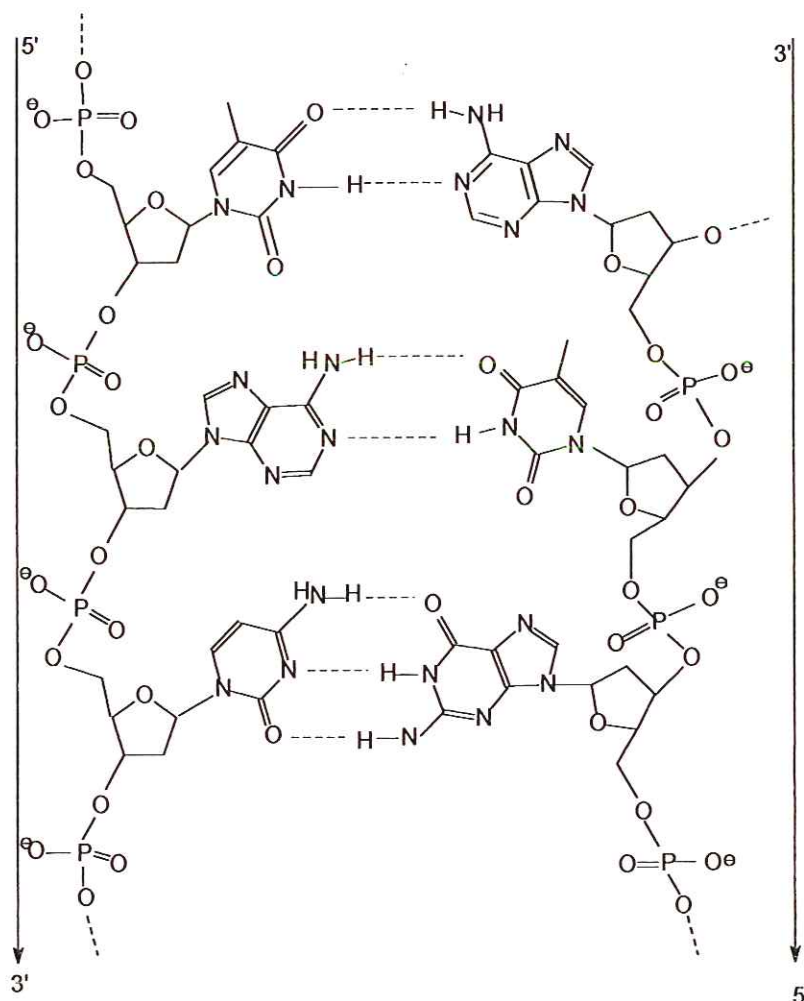


Fig. 1. - Appariement de bases complémentaires par liaisons hydrogène.

* Universidade do Algarve, U.C.T.A., Campus de Gambelas, 8000 Faro - Portugal. Fax: 351-89-818419.

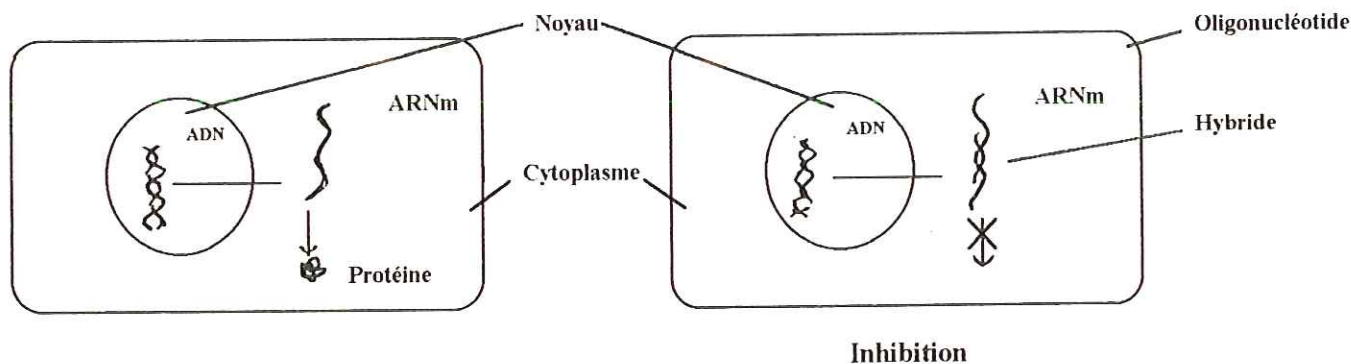


Fig. 2. - Principe d'action des oligonucléotides antisens.

C'est cette différence qui confère à chaque segment ses propriétés fonctionnelles chez un organisme vivant. Un ARN messenger particulier sera traduit en une protéine donnée. Un autre ARN messenger avec une autre séquence nucléotidique, codera pour une autre protéine, suivant la spécification du code génétique. Une telle séquence particulière dans l'ADN est reconnue par une enzyme et servira de signal pour le déroulement d'un processus biologique donné. Des ensembles de séquences peuvent constituer un réseau d'informations utilisées pour le déclenchement de fonctions interliées de façon plus ou moins complexe. Il est concevable d'atteindre le fonctionnement d'un ADN ou d'un ARN particulier en le bombardant avec une molécule nucléotidique exogène ayant une séquence en nucléotides complémentaire de celle de la région cible que l'on désire inactiver.

Le phénomène d'hybridation extrêmement spécifique, déterminé par la complémentarité des bases est susceptible d'interférer avec la fonction de la séquence cible. L'approche est on ne peut plus sélective: on vise avec précision une fonction bien déterminée à l'avance, en employant une molécule dont la structure est définie pour interagir spécifiquement avec une région de la molécule cible.

On peut prétendre, en appliquant cette approche supprimer par exemple des infections en inhibant l'expression d'un gène codant pour une protéine essentielle d'une bactérie pathogène, ou pour la réplication d'un virus. Ou encore rendre inactive l'expression d'un oncogène (fig. 2).

Les conditions requises et les limitations.

Deux conditions fondamentales doivent être réalisées pour que cette méthodologie soit applicable :

- 1) les séquences cibles des molécules d'ADN (ARN) doivent être connues;
- 2) les molécules oligonucléotidiques inhibitrices doivent être accessibles (facilement synthétisables).

Les progrès énormes faits depuis quelques années dans le domaine des techniques de séquençage d'ADN se sont traduits par la détermination, à un rythme accéléré, de nouvelles séquences nucléotidiques, faisant grossir rapidement le volume de l'information disponible. D'autre part la synthèse chimique d'oligonucléotides de séquence définie est aujourd'hui une technique routinière et automatisée qui permet d'obtenir en quelques heures des fragments d'ADN longs de quelque dizaines de nucléotides, en petites quantités (de l'ordre des microgrammes) (1). Le grand problème est la réalisa-

tion de la synthèse à grande échelle. Celle-ci reste encore limitée par les prix très élevés des approches actuelles, incompatibles avec les applications généralisées et massives.

Le principe de l'antisens a un deuxième grand type d'application qui consiste en la détection de séquences nucléotidiques. L'intérêt le plus évident est celui du diagnostic aussi bien d'agents infectieux (bactéries, virus, parasites protozoaires...), que d'anomalies génétiques dont la cause ultime, la mutation d'un nucléotide (qui se répercute dans la mutation d'un acide aminé et donc d'une protéine) peut être détectée grâce à la spécificité de l'approche antisens.

Les deux conditions fondamentales citées, bien que nécessaires, ne sont évidemment pas suffisantes pour obtenir les effets biologiques souhaités. L'efficacité des oligonucléotides antisens en pratique dépend encore :

- 1) de leur stabilité dans les milieux physiologiques qu'ils doivent traverser jusqu'à ce que la cible soit atteinte (dans le plasma, le cytoplasme, le noyau, la mitochondrie ou d'autres compartiments cellulaires où serait logé par exemple un pathogène);
- 2) de leur capacité à traverser les membranes et les compartiments cellulaires, en un temps utile, avant d'être dégradés (la structure polyanionique des oligonucléotides est en principe défavorable à la pénétration à travers les membranes, qui constituent une barrière naturelle pour beaucoup de molécules chargées négativement);
- 3) de la cible choisie. Si la cible est l'ADN il faut atteindre le noyau cellulaire si l'organisme est un eucaryote. Dans ce cas, pour obtenir une hybridation suivant le modèle de Watson et Crick il faut que l'oligonucléotide antisens se fixe sur un fragment d'ADN au moment où le double brin est ouvert (fig. 3). Ceci a lieu par action de l'enzyme ARN polymérase qui catalyse la transcription de l'ADN en ARN. L'effet sera dans ce cas la terminaison prématurée de la transcription. Quand l'ARN est choisi pour cible on peut chercher à atteindre plusieurs régions importantes correspondant à des sites "fonctionnels":
 - a) encore dans le noyau cellulaire, les oligonucléotides antisens dirigés vers la région couvrant la jonction intron-exon peuvent bloquer l'épissage de l'ARN;
 - b) les oligonucléotides antisens peuvent aussi empêcher le transport de l'ARN messenger du noyau vers le cytoplasme (où a lieu la traduction en protéines) notamment quand la cible d'hybridation est la région correspondante au site du signal de polyadénylation;
 - c) dans le cytoplasme, l'ARN peut être empêché de s'associer aux ribosomes (si on bloque la séquence spéci-

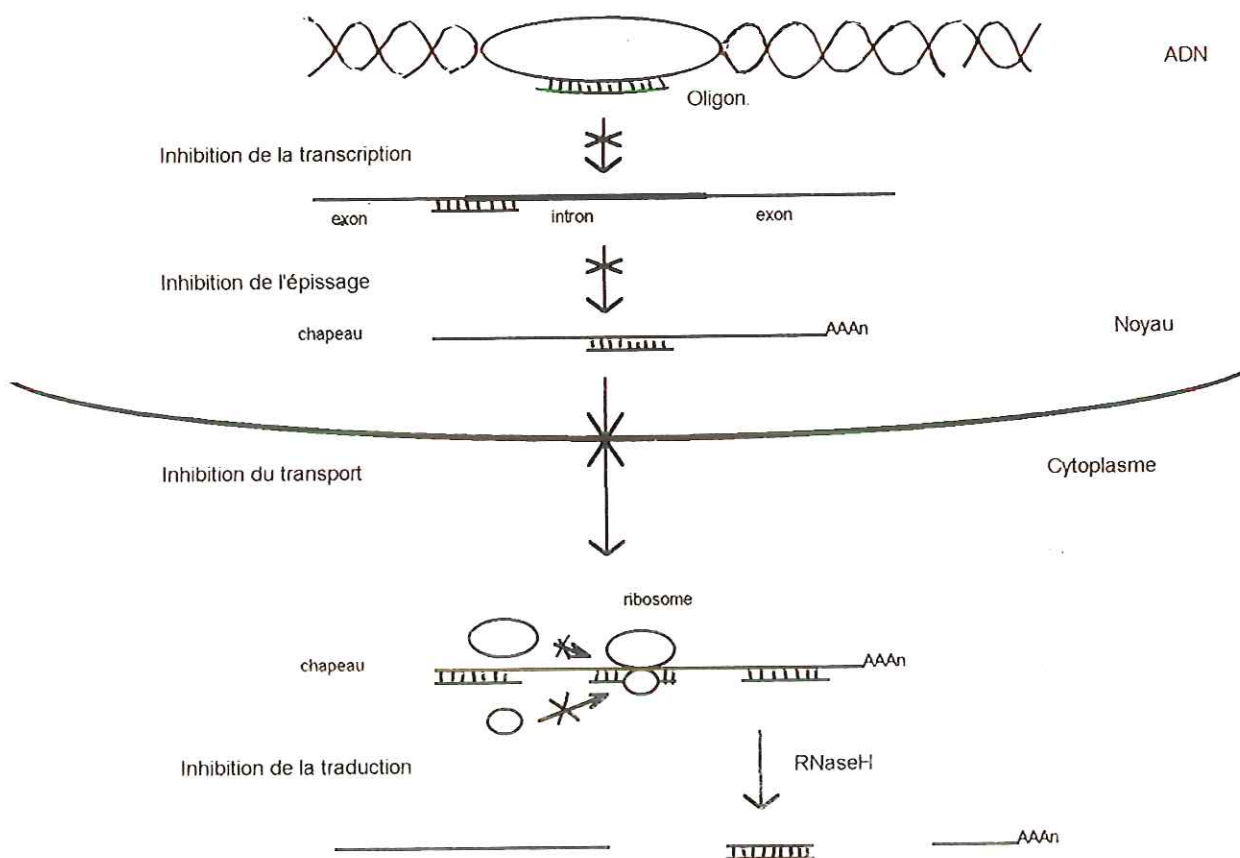


Fig. 3. - Mécanismes d'action des oligonucléotides antisens.

fique du site de liaison) ou de s'associer aux facteurs d'initiation de la traduction. Le résultat sera l'inhibition de la traduction de l'ARN en protéines.

Il n'y a pas de cible idéale a priori. L'expérience a montré qu'il faut en chaque cas d'espèce utiliser une approche empirique en essayant plusieurs cibles, pour déterminer l'effet d'inhibition le plus efficace. Néanmoins les effets les plus recherchés ont été le blocage de l'épissage et de la traduction de l'ARN;

4) du mécanisme d'inhibition lui-même. En effet, on peut concevoir un effet d'hybridation rapidement réversible par l'action d'une enzyme qui déroule l'hybride (ceci correspond à une possibilité réelle), ou au contraire que la formation du complexe hybride entraîne une dégradation de la cible, soit enzymatique (ce que l'on observe effectivement, l'enzyme étant la RNase H), soit chimique (ce qui peut être provoqué artificiellement - voir plus loin), entraînant ainsi une efficacité accrue;

5) de leur sélectivité cellulaire. En effet, le but recherché pour obtenir un effet thérapeutique, est d'atteindre un certain type cellulaire où serait logé un pathogène (par exemple, les macrophages qui sont la cible infectieuse de la mycobactérie de la lèpre) ou qui est le siège d'un oncogène. En absence de sélectivité cellulaire il y aurait un effet de "dilution" lors de l'administration de l'agent thérapeutique qui perdrait dramatiquement de l'efficacité.

Les approches : la synthèse d'analogues.

L'instabilité des oligonucléotides dans les milieux physiologiques est un fait acquis. Ils subissent notamment une dé-

gradation enzymatique par les nucléases. D'autre part l'hybride ARN-oligonucléotide peut être déstabilisé par exemple par l'action des ribosomes (assistée par des enzymes ayant une activité de déroulement), au fur et à mesure de leur avance sur l'ARN messager.

Pour rendre les oligonucléotides antisens et les hybrides qu'ils forment avec la cible, plus stables et efficaces, on a recours à la synthèse d'analogues chimiques ou/et de dérivés qui tout en maintenant leurs propriétés d'hybridation spécifique améliorent leur action.

Une grande variété de modifications d'oligonucléotides ont été introduites, que l'on peut résumer en trois grands types:

- 1) modification de la liaison internucléotidique;
- 2) modification des unités nucléosidiques. Parmi celles-ci on distingue celles des bases, celles des riboses et encore celle de la liaison N-glucosidique entre la base et le ribose;
- 3) dérivatisation aux extrémités 5' ou 3'.

1. Modification de la liaison internucléotidique.

Les analogues les plus étudiés de ce type sont les oligonucléotides méthylphosphonate et phosphorothioate, bien que beaucoup d'autres dérivés modifiés au niveau de la liaison internucléotidique aient été préparés, comme par exemple des phosphoramidates, des esterphosphates et des analogues "déphosphorylés" (dans lesquels la liaison internucléotidique phosphorylée a été remplacée par des ponts siloxane, carbonate, ester carboxyméthyle, acétamide, carbamate ou thioéther).

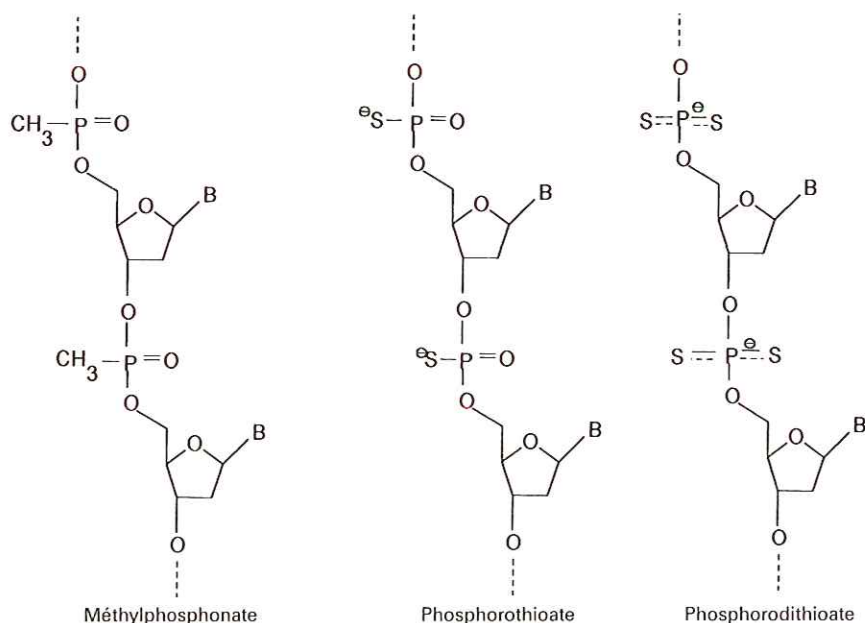


Fig. 4.

Méthylphosphonates et phosphorothioates.

Chez les oligonucléotides méthylphosphonate, l'oxygène du phosphate chargé négativement est remplacé par un groupe méthylé qui est neutre et stériquement peu encombrant (fig. 4). Le but recherché est d'augmenter la durée de demi-vie biologique des oligonucléotides antisens et d'améliorer la captation par les cellules (2).

Chez les phosphorothioates un des oxygènes sur le phosphate, non impliqué dans le pont internucléotidique, est remplacé par un atome de soufre (fig. 4). La charge négative est distribuée asymétriquement et localisée préférentiellement sur le soufre (3).

Les phosphorothioates sont, comme les méthylphosphonates, beaucoup plus stables aux nucléases que les oligonucléotides non modifiés. Ils ont l'avantage de retenir la solubilité dans les milieux aqueux, au contraire des méthylphosphonates. Un autre avantage des phosphorothioates est lié à la synthèse chimique. Les méthylphosphonates sont moins stables aux conditions basiques de clivage du support solide et de déprotection des bases parce que le pont internucléotidique méthylphosphonate est plus labile que la liaison internucléotidique naturelle et que les phosphorothioates.

Un problème supplémentaire est celui posé par le nouveau centre chiral introduit par le substituant non naturel sur l'atome de phosphore. Tant les méthylphosphonates que les phosphorothioates admettent deux configurations, R^P et S^P au niveau du pont internucléotidique (le substituant CH_3 ou S peuvent "pointer", soit vers l'intérieur de la double hélice de l'ADN, soit vers le milieu extérieur) (fig. 5). Comme la synthèse oligonucléotidique courante n'est pas stéréospécifique, à chaque étape de l'élongation dans laquelle un nouveau lien internucléotidique est formé il se crée un nouveau centre chiral.

n Etapes d'élongation conduiront donc à 2^n diastéréoisomères. La configuration dans laquelle le substituant S ou CH_3 "pointe" vers l'extérieur de la double hélice de l'ADN est considérablement plus favorisée stériquement (fig. 5).

Il est donc prévisible que certains isomères s'hybrident mieux que d'autres aux séquences cibles. Le résultat en sera une perte d'efficacité pour une concentration totale donnée en oligonucléotide. Le problème de la chiralité peut être évité si le second atome d'oxygène sur l'atome de P d'un phosphorothioate, non impliqué dans le pont internucléotidique est aussi remplacé par un atome de soufre. L'analogue résultant est un phosphorodithioate (4) (fig. 4).

Un manque de spécificité des oligonucléotides phosphorothioates a été observé dans certains cas. Des phosphorothioates homooligomériques peuvent avoir une activité semblable à celle des oligomères de séquence complémentaire de la cible, notamment quand les concentrations augmentent ($> 20 \mu\text{g/ml}$). Leur action obéit certainement à plus d'un mécanisme (5).

2. Modifications des unités nucléosidiques.

Oligonucléotides α -anomériques.

Chez ces dérivés le C anomérique des liaisons N- glucosidiques a une configuration opposée à celle du C anomérique des nucléosides naturels qui est β (fig. 6).

Les oligonucléotides α -anomériques forment une hélice stable avec une chaîne complémentaire, mais les deux chaînes ont une polarité parallèle. Les oligonucléotides α -anoméri-

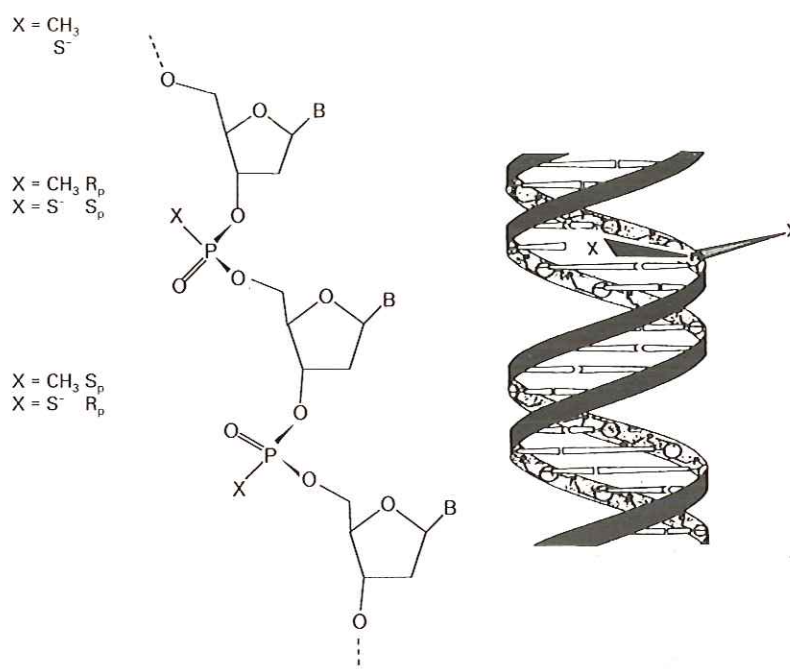
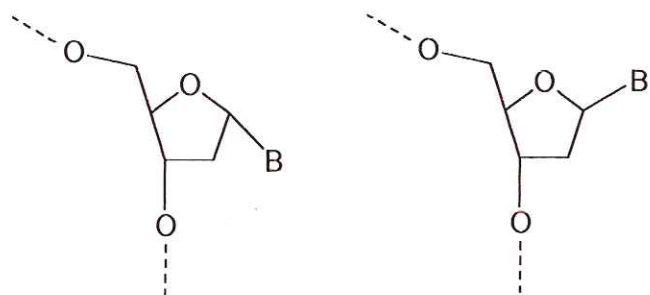


Fig. 5. - Configuration R et S des méthylphosphonates et des phosphorothioates.

ques sont extraordinairement stables aux nucléases et ont d'excellentes propriétés d'hybridation avec des T^f bien supérieures à leurs analogues β, mais leur activité biologique inhibitrice est très faible ou inexistante (6). Il est possible que couplés à des agents chimiquement réactifs ils acquièrent des propriétés inhibitrices.



Configuration α-anomérique Configuration β-anomérique naturelle
Fig. 6. - B = base hétérocyclique.

Oligodésoxyribonucléotides avec des bases modifiées.

Nous venons de voir que les oligonucléotides α-anomériques stabilisent fortement le duplex formé avec la séquence complémentaire. Une autre approche qui vise à augmenter la stabilité du duplex entre l'oligonucléotide et la cible, c'est-à-dire, la T^f de l'hybride consiste à introduire des bases modifiées qui forment des appariements plus stables avec les bases complémentaires, grâce à une augmentation du nombre de liaisons hydrogène. Un exemple en est la diaminopurine (DAPu) qui forme trois liaisons hydrogène avec la thymine, alors que la base complémentaire naturelle, l'adénine n'en forme que deux (7) (fig. 7).

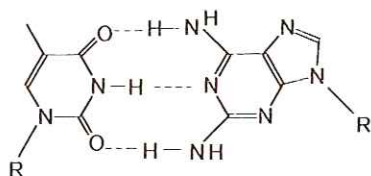
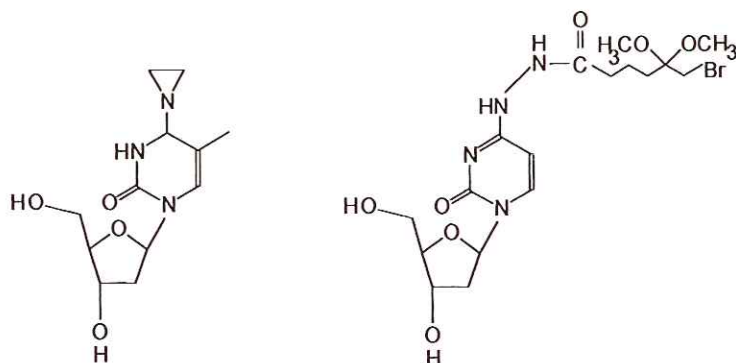


Fig. 7. - augmentation de la stabilité de l'appariement de la thymine (3 liaisons H avec la DAPu).

Une approche très intéressante est celle qui cherche à introduire des groupes capables de réagir avec la séquence cible de manière à l'inactiver de manière irréversible. Il faut que la réaction ait lieu de préférence seulement après l'hybridation, afin d'éviter des interactions non spécifiques.



N⁴,N⁴-éthano-5-méthylcytosine

Cytidine-4-(6-bromo-5,5-diméthoxy)hexanhydrazide

Fig. 8.

La N⁴,N⁴-éthano-5-méthylcytosine et la cytidine-4-(6-bromo-5,5-diméthoxy)hexanohydrazide sont des exemples de nucléosides modifiés sur les bases par des groupes alkylants introduits en deux étapes sur les oligonucléotides antisens (8) (fig. 8). La base complémentaire de la cytosine, la guanine peut être alkylée après l'hybridation. Cependant la vitesse est trop faible pour que la modification ait une utilité pratique.

Modifications sur le cycle furanonique.

Les oligoribonucléotides ont l'avantage, par rapport aux oligodésoxyribonucléotides de faire appel à des dérivés de base de la synthèse (les ribonucléotides) qui sont beaucoup moins chers que leurs analogues de la série désoxy. Le problème principal de la synthèse est la protection appropriée du groupe hydroxylique en 2'. Le groupe protecteur doit être stable dans les conditions de la synthèse, en particulier lors de la déprotection du groupe 5'-OH et doit être enlevé à la fin de la synthèse en conditions qui évitent l'isomérisation et le clivage du pont phosphate diester.

Malgré les progrès réalisés dans la synthèse en phase solide des oligoribonucléotides, les rendements par cycle sont encore légèrement inférieurs à ceux obtenus en série désoxy.

Les oligoribonucléotides sont particulièrement instables en milieu physiologique. Le groupe hydroxylique en 2' responsable de cette instabilité a été bloqué en groupe méthoxy. Les 2'-O-méthylribonucléotides forment des hybrides avec l'ARN complémentaire, qui ont une stabilité thermique très supérieure aux hybrides correspondant ADN-ARN (9) (fig. 9).

Leur synthèse s'effectue avec une efficacité comparable à celle de la synthèse des oligodésoxyribonucléotides.

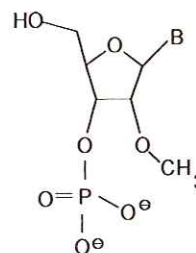


Fig. 9. - 2'-O-méthylribonucléotide.

REFERENCES

- (1a) Alfredo CRAVADOR (1984), *Chimie Nouvelle*, **2** (6), 71.
- (1b) SONVEAUX, E. (1986), *Bioorg. Chem.*, **14**, 274.
- (2) MILLER, P.S. (1991), *Biotechnology*, **9**, 358.
- (3) IYENGAR, R.; ECKSTEIN, F.; FREI, P.A. (1984), *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 8309.
- (4) BRILL, W.K.-D.; TANG, J.-Y.; MA, Y.-X.; CARUTHERS, M.H. (1989), *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 2321.
- (5) AGARWAL, S.; GOODCHILD, J.; CIVEIRA, M.P.; THORNTON, A.T.; SARIN, P.M.; ZAMECNICK, P.C. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 7079.
- (6) LEONETTI, J.P.; RAYNER, B.; LEMAITRE, M.; GAGNOR, C.; MILHAUD, P.G.; IMBACH, J.-L.; LEBLEU, B. (1988), *Gene*, **72**, 323.
- (7) CHOLET, A.; KAWASHIMA, E. (1988), *Nucleic Acids Res.*, **16**, 305.
- (8) WEBB, T.R.; MATEUCCI, M.D. (1986), *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2764.
- (9) INOUE, H.; HAYASE, Y.; IMURA, A.; IWAI, S.; MIURA, K.; OHTSUKA, E. (1987), *Nucleic Acids Res.*, **15**, 6131.