

Les oligonucléotides synthétiques "antisens"

(2^e partie)

Alfredo CRAVADOR*

3. Dérivatisation aux extrémités.

La voie la plus utilisée pour synthétiser des conjugués d'oligodésoxyribonucléotides est la phosphorylation de l'extrémité 5'OH avec des agents de phosphorylation appropriés. Cette voie est intéressante parce que la dérivation peut être effectuée en phase solide dans des conditions similaires à celles de la synthèse.

Des méthodes universelles pour fixer des groupes fonctionnels sur les oligonucléotides ont été développées. Elles font appel à des groupes aminés et mercapto introduits sous forme de linkers aminoalkylés et mercaptoalkylés.

Les oligonucléotides peuvent encore être liés de façon covalente à une grande variété de molécules.

Les agents intercalants.

Les groupes intercalants ont la propriété de se fixer entre les deux brins de la double hélice en formant des complexes avec les bases hétérocycliques. L'attachement d'un groupe intercalant à l'extrémité d'un oligonucléotide accroît son affinité envers la cible en fournissant une énergie de liaison supplémentaire. En outre, l'agent intercalant, contribue en général, également à aider l'oligonucléotide à pénétrer dans les cellules à cause de son caractère lipophile et quand la dérivation se fait en 3' la stabilité de l'oligonucléotide envers les 3'-exonucléases s'améliore considérablement. En plus la spécificité envers la séquence cible est retenue.

Parmi les agents intercalants les plus étudiés figurent les dérivés de l'acridine. Le groupe de C. Hélène *et al.* a décrit, pour la première fois en 1983, des complexes d'hybridation avec un oligonucléotide comportant un groupe aminoacridine à l'extrémité 3', fixé par une liaison phosphate (10). Il a montré qu'il y a un gain de stabilité du duplex par rapport aux oligonucléotides non dérivatisés.

L'introduction des dérivés de l'acridine s'est étendu aux oligonucléotides phosphorothioate, méthylphosphonate, α -anomérique, tant en 3' qu'en 5'.

Ainsi le groupe 2-méthoxy-6-chloro-9-(5-hydroxypen-

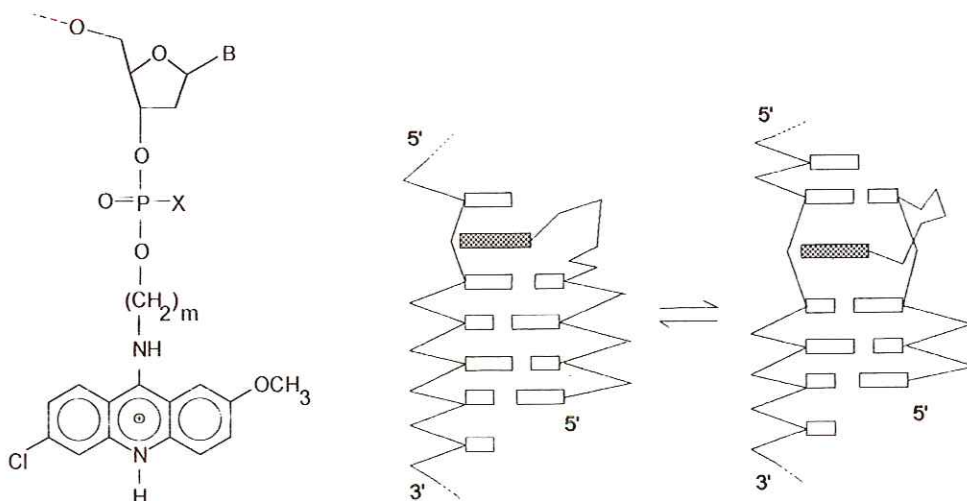


Fig. 10. - Oligonucléotide dérivatisé avec un groupe acridine. Action intercalante du groupe acridine.

tyl)aminoacridine a été introduit dans l'extrémité 5' d'oligodésoxyribonucléotides non modifiés ou modifiés par ailleurs, tels que les méthylphosphonates et les dérivés α -anomériques, par voie de son dérivé phosphoramidite (11).

Le groupe le plus utilisé en 3', notamment par Hélène *et al.* est le 2-méthoxy-6-chloroacridine introduit par voie de la chimie du phosphatetriester (12). Le mode d'action de l'agent intercalant est représenté schématiquement dans la figure 10. L'anneau aromatique de l'acridine peut se fixer soit à l'extrémité de la dernière base ou s'introduire entre deux paires de bases de l'oligonucléotide.

Les oligonucléotides alkylants.

L'idée sous-jacente à l'utilisation d'oligonucléotides conjugués à des agents alkylants est de provoquer une modification irréversible de l'ADN au moment de l'hybridation.

L'agent le plus étudié est le groupe (N-(2-chloroéthyl)-N-méthylamino)-benzylamine, introduit par Grineva *et al.* en 3' au moyen d'une liaison acétal. Les groupes alkylants ont aussi été attachés en position 5' au moyen d'une liaison phosphoramidate (13) (fig. 11).

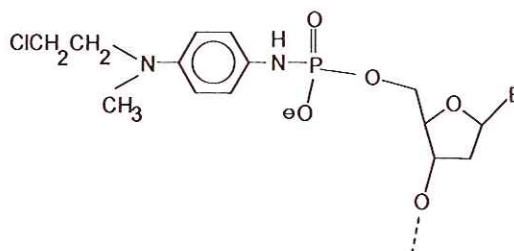


Fig. 11. - Oligonucléotide alkylant.

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

L'azote en tant que groupe voisin participant, confère au groupe chloroéthylamino une tendance particulière à l'alkylation et par conséquent au cross-linking.

Il est important qu'une réaction d'autoalkylation n'ait pas lieu afin de préserver la spécificité de l'effet.

La réaction a lieu en deux étapes. Initialement il se forme, par cyclisation intramolécule, un cation éthylimmonium, lequel attaque ensuite des nucléophiles facilement accessibles. Nous avons déjà vu l'alternative pour effectuer le cross-linking, basée sur le 5-méthyl-N⁴,N⁴-éthanocytosine, qui dispense l'étape de cyclisation, mais qui est peu utile en raison de la vitesse très faible de la réaction d'alkylation.

Les endonucléases artificielles.

Par endonucléases artificielles on entend des conjugués capables de cliver l'ADN spécifiquement. La spécificité est fournie par l'hybridation de l'oligonucléotide avec les séquences complémentaires.

Parmi les groupes qui ont été liés de façon covalente à l'extrémité d'oligonucléotides et qui ont une activité endonucléasique, figurent les complexes de métal, tels que l'EDTA-Fe(II)(éthylènediaminotétracétate), le o-phénanthroline-Cu(I)(14), ou la porphyrine-Fe(II) (15). L'extrémité 5' a été la plus utilisée. La figure 12 montre un exemple de dérivatisation avec l'EDTA par voie d'un groupe alkylaminé et acylation avec le dianhydride de l'EDTA (16).

L'activité nucléasique assurée par la production locale de radicaux hydroxyliques nécessite une incubation avec du Fe(II).

Le groupe EDTA a aussi été introduit dans la position 5 de

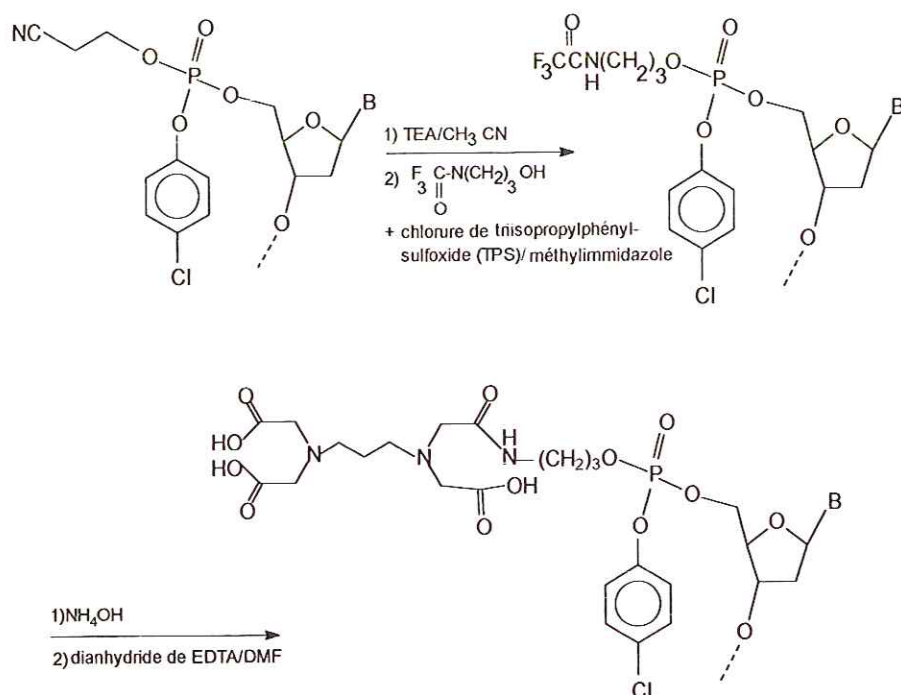


Fig. 12. - Dérivatisation d'un oligonucléotide avec l'EDTA.

la thymine au moyen des linkers acide propionique et 2-aminoéthylamide et acylation avec le dianhydride de l'EDTA. Le synthon ainti obtenu peut alors être incorporé en n'importe quelle position de l'oligonucléotide. La dérivatisation n'est plus dans ce cas limitée aux extrémités 5' ou 3'.

Les conjugués avec la phénanthroline se préparent de manière semblable.

La position 3' a été utilisée moins souvent pour introduire des groupes de clivage de l'ADN.

Une constante de cette approche est la nécessité d'effectuer une métallation en présence d'un agent réducteur, après hybridation, pour obtenir activité nucléasique.

Une approche différente fait appel à l'activité d'une endonucléase enzymatique non spécifique et d'accès facile, en la conjuguant avec un oligonucléotide qui encore une fois a la fonction d'assurer la spécificité envers la cible. Un exemple de cette voie est la nucléase de staphylocoque (enzyme extracellulaire composée de 149 acides aminés), qui a été conjuguée à un oligonucléotide par l'établissement d'une liaison covalente disulfure (17) (fig. 13).

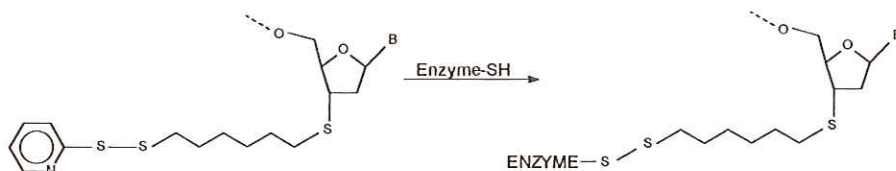


Fig. 13. - Schéma général de synthèse d'un conjugué enzyme-oligonucléotide par échange de liaison disulfure.

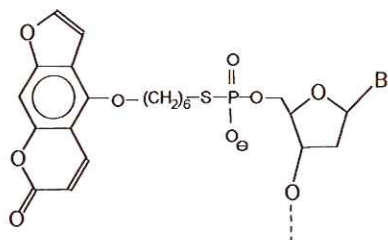
L'hydrolyse de l'ARN cible s'effectue de manière très précise sur une seule liaison phosphodiester, mais nécessite le cofacteur Ca²⁺, ce qui limite l'utilisation de cette stratégie aux applications *in vitro*, puisque il n'est pas possible d'éliminer le Ca²⁺ *in vivo* en utilisant des agents de chélation.

La phosphatase alcaline est un autre exemple d'enzyme qui a été couplée à un oligonucléotide (18).

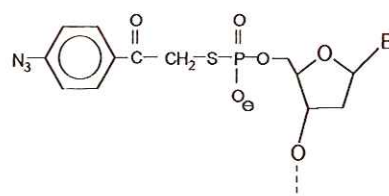
Cross-linkers activés photochimiquement.

A côté des cross-linkers chimiques que nous venons d'étudier, il existe un autre type de "liaison croisée" qui est réalisée par irradiation. Les dérivés les plus étudiés sont ceux du psoralène (19) (fig. 14). A la suite de l'irradiation avec de la lumière de longueur d'onde d'environ 365 nm, ces agents intercalants causent une interaction entre deux bases (le plus souvent des thymines) donnant lieu à des cyclobutanes. La photoréaction des bases, suivie de traitement alcalin, conduit au clivage de ce cross-linking.

Les dérivés p-azidophénacyle sont aussi utilisés en tant qu'agents de cross-linking. Ils conduisent à la formulation de radicaux nitrène, très réactifs, après irradiation à > 300 nm (20) (fig. 14).



Conjugué avec le psoralène.



Conjugué avec l'azidophénacyle.

Fig. 14.

Conjugués avec des agents transporteurs et oligonucléotides-peptides.

Le transport des oligonucléotides vers l'intérieur des cellules est facilité par l'attachement à des peptides.

Le groupe de Lebleu *et al.* (21) a couplé la poly-L-lysine de poids moléculaire 50000 à des oligonucléotides antisens. L'approche suivie est semi-enzymatique et semi-chimique. Il a utilisé l'enzyme ligase de l'ARN du phage T4 pour prolonger l'extrémité 3' de l'oligonucléotide d'une unité ribosique, qui a été ensuite oxydée avec du periodate, condensée avec le groupe 6-aminé de la polylysine et réduite avec NaBH_3CN en dérivé N-morpholine (fig. 15).

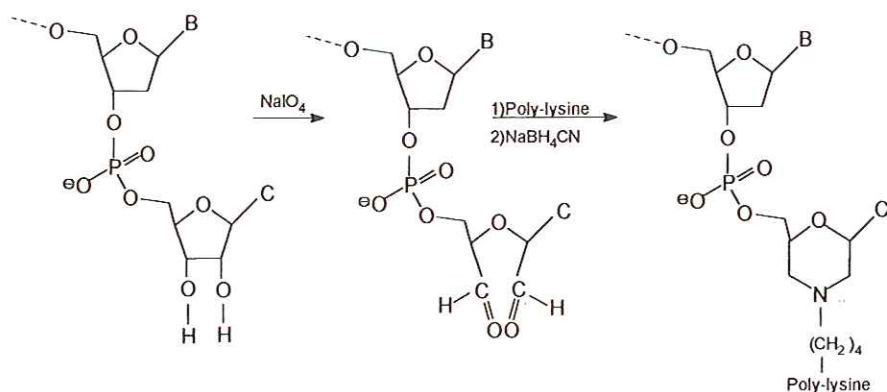


Fig 15. - Synthèse d'un oligonucléotide conjugué en 3' avec la polylysine.

L'effet de pénétration a été impressionnant, comparé avec les résultats usuels. L'inhibition antivirale spécifique en culture cellulaire a été obtenue avec des concentrations de l'ordre de 100 nM, alors que précédemment il fallait des concentrations de l'ordre du micromolaire pour obtenir un effet.

Cette performance accrue peut s'expliquer par une combinaison de deux effets: la stabilisation envers les 3' exonucléases et une amélioration de la pénétration due à un effet de stabilisation de l'hélice induite par la polycation. La polylysine a cependant le désavantage d'avoir un effet toxique à des concentrations de 2 μM et d'induire la formation d'agrégats avec les oligonucléotides, ce qui pose des difficultés expérimentales.

La synthèse de nucléopeptides a été effectuée en établissant des liaisons esterphosphate avec les chaînes latérales de la tyrosine et la sérine. Plus générale cependant est la méthode qui consiste à assembler successive-

ment en phase solide une unité peptidique et une unité oligonucléotidique. La chaîne peptidique est synthétisée sur le support solide par la méthode de Fmoc. Ensuite un bras 4-hydroxybutyrylique est attaché, sur lequel s'initie la synthèse de l'oligonucléotide (22).

L'attachement de transporteurs spécifiques est l'approche qui devrait donner les meilleurs résultats dans le futur. Par exemple, la conjugaison d'oligonucléotides avec une protéine qui participe au processus de captation cellulaire induit par les récepteurs des macrophages (le MBSA, pour "maleylated bovine serumalbumine"), pourrait être utile pour le traitement de la leishmaniose (le parasite pathogène se loge dans les macrophages). Les oligonucléotides antisens pourraient aussi être couplés à des protéines non toxiques de l'enveloppe de virus ou à des toxines "détoxifiées" de bactéries, pour faciliter la pénétration cellulaire.

Conjugués à des transporteurs lipophiliques et incorporés dans les liposomes.

Les agents lipophiliques facilitent aussi la captation des oligonucléotides antisens par les cellules. Plusieurs groupes ont synthétisé des conjugués d'oligonucléotides avec le cholestérol (23) et avec des alcools à longue chaîne lipidique (24) en utilisant souvent les liaisons esterphosphate dans la position 5' des oligonucléotides et quelquefois la position 3' (notamment avec le cholestérol) (fig. 16). Très souvent les oligonucléotides sont modifiés en phosphorothioates. Ces dérivés rendus lipophiliques présentent un fort accroissement de leur activité inhibitrice, qui peut être dû à une augmentation de la stabilité et à l'interaction avec les couches lipidiques des membranes cellulaires. Les effets observés ne sont pas toujours du type antisens, ce qui corrobore l'observation sur le manque de spécificité des phosphorothioates.

Un autre moyen d'améliorer la pénétration des oligonucléotides antisens à travers les membranes, fait appel à leur

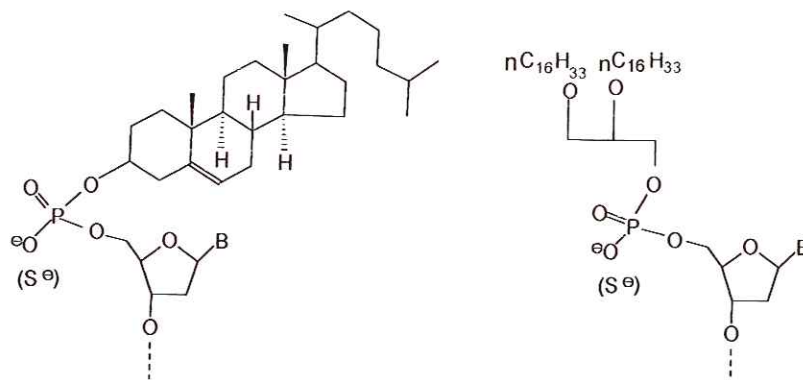


Fig. 16. - Oligonucléotides conjugués à des dérivés lipidiques.

incorporation dans les liposomes. Ces particules microscopiques, composées de bicouches lipidiques pénètrent dans les cellules par phagocytose ou endocytose.

Le temps de demi-vie des liposomes conventionnels dans le sérum est très court en raison de leur captation rapide par le système réticuloendothélial du foie et de la rate. Cependant des travaux visant à produire des liposomes plus stables sont en développement. Néanmoins l'incorporation des oligonucléotides dans les liposomes est très peu documentée. Il serait intéressant d'essayer cette approche, notamment avec des immunoliposomes sur lesquels on incorpore des anticorps pour attaquer spécifiquement les cellules qui contiennent l'antigène de surface correspondant. On pourrait ainsi réaliser un double ciblage, celui des cellules visées et celui du matériel génétique à inhiber, tout en protégeant et en transportant l'oligonucléotide à l'intérieur de la cellule.

Les résultats.

Un très grand nombre d'essais d'inhibition antisens a été décrit dans les revues de la spécialité. Le domaine le plus exploité est sans doute l'inhibition virale. Néanmoins les parasites protozoaires et les oncogènes des protéines régulatrices sont des exemples d'autres cibles qui ont été l'objet de nombreuses études d'inactivation avec les oligonucléotides antisens.

Citons parmi les virus étudiés, celui du SIDA (VIH), de l'hépatite B, de l'herpes simplex, de l'influenza, de la stomatite vésiculaire, du sarcoma de Rous. Le VIH-1 a été testé avec des oligonucléotides non modifiés, des phosphorothioates, des phosphoramidates, des méthylphosphonates, des conjugués avec le cholestérol. Tous inhibent l'activité du virus en culture. Les séquences cibles les plus efficacement inhibées sont les sites d'épissage de l'ARN et les sites de liaison des amorces du VIH (25), où démarre la transcription du génome viral.

Un modèle animal, celui de la souris (choisi en raison de son faible poids qui exige des quantités plus faibles d'oligonucléotides qui sont encore très coûteux) a été employé pour tester l'efficacité inhibitrice des oligométhylphosphonates contre le virus de l'herpes (HSV-1). L'application de ces méthylphosphonates sous forme d'une crème sur l'oreille infectée d'une souris empêche les lésions causées par l'HSV.

Les souris sont aussi partiellement protégées (~ 50 %) contre l'infection causée par le virus mortel de l'encéphalite par des oligonucléotides antisens portant des groupes alkylants, notamment le (N(2-chloroéthyl)-N-méthylamino)benzylamine (26).

Il est aussi à signaler l'effet parasitocide obtenu contre le protozoaire monocellulaire *Trypanosoma brucei*, responsable de la maladie du sommeil chez l'homme. Quand on incube *T. brucei* en présence d'oligonucléotides antisens dérivés avec l'intercalant acridine, les parasites cessent définitivement de se mouvoir (27). La cible choisie dans ce cas a été la séquence du mini-exon, constitué par 35 nucléotides, commune à l'extrémité 5' des ARN messagers du parasite.

Un domaine d'application très prometteur est celui de la thérapie du cancer. Le proto-oncogène *c-myc*, dont la surexpression est mise en corrélation avec le cancer des pou-

mons, du côlon et avec les neuroblastomes, a été l'objet de divers travaux. Le groupe de B. Lebleu notamment a réussi à inhiber l'expression du gène *c-myc*, en cellules en culture, en employant des oligonucléotides liés de façon covalente à de la poly(L-lysine), dirigés contre la région du codon d'initiation et des quatre codons suivants de l'ARN messenger de *c-myc* (28).

En plus des applications à des fins médicales, les oligonucléotides antisens possèdent un extraordinaire potentiel dans la recherche de la fonction des gènes aussi bien *in vitro* que *in vivo*.

Un exemple d'essai visant à élucider le rôle de biomolécules spécifiques est celui qui a permis d'établir qu'une molécule bien précise produite par le cœur, le facteur de transformation de croissance $\beta 3$ (TGF $\beta 3$) joue un rôle essentiel dans la transformation épithélial-mésenchyme de la cellule (29). Les essais ont été réalisés sur des "explants" de cœur d'embryons de poulet, traités par des oligonucléotides phosphoramidates antisens dirigés vers des régions non conservées des gènes des facteurs TGF $\beta 1$, -2, -3, et -4 et ont montré que seul celui dirigé contre le gène de TGF $\beta 3$ inhibe le développement du mésenchyme cellulaire.

Encore plus spectaculaires ont été les essais réalisés pour inhiber l'accumulation *in vivo* de cellules de muscle lisse artériel. Le proto-oncogène *c-myb* est synthétisé en divers types cellulaires et contrôle la croissance et la différenciation cellulaire. Il est notamment impliqué dans la prolifération induite par des mitogènes des cellules de muscle lisse vasculaire (SMC), qui constitue le chemin majeur de l'athérogenèse. Les essais réalisés *in vivo* ont consisté en la livraison locale d'oligonucléotides phosphorothioate antisens dirigés contre la position 4 à 22 de la séquence nucléotidique de *c-myb* (30). Pour cela les auteurs ont inséré un cathéter dans les artères carotidiennes de rats, dénudant l'endothélium, ce qui induit une haute migration et prolifération de SMC tout le long du vaisseau sanguin affecté, provoquées par la synthèse et le relâchement de mitogènes. Pour faire agir les oligonucléotides, ceux-ci ont été appliqués sous forme de solution pluronique, sur l'artère carotidienne, juste après l'insertion du cathéter. Au contact avec les tissus à 39°, la solution coagule, formant une couche de gel enveloppant la région traitée. Les blessures ont été fermées après l'application du gel et les rats ont été placés dans leurs cages. Deux semaines plus tard la portion traitée du vaisseau sanguin a été enlevée et les niveaux de l'ARN messenger de *c-myb* ont été déterminés chez les animaux traités avec les oligonucléotides antisens et les contrôles. Contrairement aux contrôles, les artères carotidiennes des rats traités ne présentaient pas de l'ARN de l'oncogène. En outre, l'examen morphologique a révélé qu'il n'y avait pratiquement pas d'accumulation de SMC chez les animaux traités avec les oligonucléotides antisens, alors qu'une accumulation importante a été observée chez les contrôles.

Ceci montre que l'expression de *c-myb* est essentielle au fonctionnement de cette voie mitogénique et suggère que les dérivés des oligonucléotides antisens pourraient être utilisés en tant qu'agents thérapeutiques des maladies cardiovasculaires.

Les perspectives futures.

Les succès décrits dans de nombreux travaux montrent que les oligonucléotides antisens et leurs dérivés exercent un

effet inhibiteur au sens propre, lié à la spécificité de leur interaction avec la cible. Leur action peut être améliorée en synthétisant des analogues appropriés.

Les résultats obtenus *in vivo* ouvrent des perspectives encourageantes et incitent à de nouveaux développements, d'autant plus que des problèmes de toxicité n'ont pas été rencontrés bien que des études plus approfondies et complètes soient nécessaires dans ce domaine.

Il est cependant indispensable que des progrès soient réalisés visant à diminuer le coût de la synthèse qui rend la production de quantités utiles aux applications en masse irréalisable. C'est un défi aux chimistes qui doivent trouver de nouvelles approches de synthèse.

Les recherches futures doivent encore se pencher sur l'amélioration de l'efficacité des oligonucléotides à travers les membranes et sur leur pilotage spécifique à l'intérieur des cellules et des compartiments cellulaires où se trouve la cible. Cela augmenterait leur efficacité et devrait diminuer les coûts.

Ces difficultés ne devraient pas constituer un découragement à la recherche, qui devrait au contraire être fortement soutenue dans ce domaine, car nous sommes probablement en passe de dominer un nouveau type d'agent thérapeutique aux potentialités pratiquement illimitées.

REFERENCES

- (10) ASSELINE, U.; THUONG, N.T.; HÉLÈNE, C. (1983), *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 297, série II, 369.
- (11) THUONG, N.T.; CHASSIGNOL, M. (1988), *Tetrahedron Lett.*, 29, 5905.
- (12) ASSELINE, U.; THUONG, N.T.; HÉLÈNE, C. (1986), *Nucleosides Nucleotides*, 5, 45.
- (13) KNORRE, D.G.; VLASSOV, V.V.; ZARYTOVA, V.F.; KARPOVA, G.G. (1985), *Adv. Enzyme Regul.*, 24, 277.
- (14) CHEN, C.-H.; SIGMAN, D.S. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 7174.
- (15) LE DOAN, T.; PERROUULT, L.; CHASSIGNOL, M.; THUONG, N.T.; HÉLÈNE, C. (1987), *Nucleic Acids Res.*, 15, 8643.
- (16) BOUTORIN, A.S.; VLASSOV, V.V.; KAZAKOV, S.A.; KUTIYAVIN, I.V.; PODYMINOIN, M.A. (1984), *FEBS Lett.*, 172, 43.
- (17) ZUCKERMANN, R.N.; COREY, D.R.; SCHULTZ, P.G. (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 1614.
- (18) JABLONSKI, E.; MOOMAW, E.W.; TULLIS, R.H.; RUTH, J.L. (1986), *Nucleic Acids Res.*, 14, 6115.
- (19) LEE, B.L.; BLAKE, K.R.; MILLER, P.S. (1988), *Nucleic Acids Res.*, 16, 10681.
- (20) PRASEUTH, D.; PERROUULT, L.; LE DOAN, T.; CHASSIGNOL, M.; THUONG, N.; HÉLÈNE, C. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 1349.
- (21) LEMAÎTRE, M.; BAYARD, B.; LEBLEU, B. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 648.
- (22) HARAMLIBIDIS, J.; DUNCAN, L.; TREGGAR, G.W. (1987), *Tetrahedron Lett.*, 28, 5199.
- (23a) LETSINGER, R.L.; ZANG, G.; SUN, D.K.; IKEUCHI, T.; SARIN, P.S. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 6553.
- (b) de SMIDT, P.C.; LE DOAN, T.; de FALCO, S.; van BERKEL, T.J.C.; (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19, 4695.
- (c) FAROOQUI, F.; SARIN, P.S.; SUN, D.; LETSINGER, R.L. (1991), *Bioconjugate Chem.*, 2, 422.
- (d) STEIN, C.A.; PAL, R.; DeVICO, A.L.; HOKE, G.; MUMBAUER, S.; KINSTLER, O.; SARGADHARAN, M.G.; LETSINGER, R.L. (1991), *Biochemistry*, 30, 2439.
- (24) GOODCHILD, J.; LETSINGER, R.L.; SARIN, P.S.; ZAMECNICK, P.C. (1988), *Human Retroviruses, Cancer and AIDS, Approaches to Prevention and Therapy*, Alan, R. Liss, New York, p. 423.
- (25a) SMITH, C.C.; AURELIAN, L.; REDDY, M.P.; MILLER, P.S., Ts'O, P.O.P. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 2787.
- (b) GOODCHILD, J.; AGRAWAL, S.; CIVEIRA, M.P.; SARIN, P.S., SUN, D.; ZAMECNICK, P.C. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 5507.
- (26) Meeting on "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression: Therapeutic Implications", June, 18-21 (1989), Rockville, MD.
- (27) VERSPIEREN, P.; CORNELISSEN, A.W.C.A.; THUONG, N.T.; HÉLÈNE, C.; TOULMÉ, J.-J. (1987), *Gene*, 61, 307.
- (28) DEGOLS, G.; LEONETTI, J.-P.; MECHTI, N.; LEBLEU, B. (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19, 945.
- (29) POTTS, J.D.; DAGLE, J.M.; WALDER, J.A.; WEEKS, D.L. and RUNYAN, R.B. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, 1516.
- (30) SIMONS, M.; EDELMAN, E.R.; DE KEYSER, J.-L.; LANGERS, R. and ROSENBERG, R. (1992), *Nature*, 359, 67.