

Oligonucléotides chimiquement modifiés : outils diagnostiques et agents thérapeutiques prometteurs. Méthodes permettant d'étudier leur stabilité et sélectivité d'appariement

Marina BOCCONGELLI, Kristin BARTIK*

Université Libre de Bruxelles, Faculté des Sciences Appliquées, Ingénierie Moléculaire et Biomoléculaire
CP165/64, 50 av F.D. Roosevelt, 1050 Bruxelles, tel: +32-2-650.35.86, Fax: +32-2-650-36-06, kbartik@ulb.ac.be

Chemically Modified Oligonucleotides: Promising Diagnostic Tools and Therapeutic Agents. Methods Available to study their Stability and Pairing Selectivity.

Abstract

Le séquençage du génome, et plus particulièrement de gènes impliqués dans l'apparition de pathologies génétiques, conduit au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et de nouveaux outils de diagnostic visant le matériel génétique. Dans ce cadre, un grand intérêt est porté aux oligonucléotides chimiquement modifiés qui possèdent la même spécificité d'appariement que les oligonucléotides naturels, mais qui présentent une meilleure affinité et une meilleure sélectivité d'appariement avec les acides nucléiques. Différentes méthodes physiques peuvent être utilisées pour caractériser la stabilité et la sélectivité d'appariement des oligonucléotides. Nous les présentons ici brièvement ainsi que quelques résultats que nous avons obtenus lors de l'étude d'un oligonucléotide chimiquement modifié (Locked Nucleic Acid).

Mots-clé

Oligonucléotides, stabilité de la structure, RMN, calorimétrie

1. Introduction

Une des propriétés remarquables des polymères d'acides nucléiques (acide désoxyribonucléique, ADN, et acide ribonucléique, ARN) est leur spécificité d'appariement qui résulte de la complémentarité de leurs bases azotées : adénine-thymine (A-T), cytosine-guanine (C-G). Dans le cadre du traitement de maladies d'origine génétique, les oligonucléotides (courtes séquences de nucléotides) sont des outils de diagnostic et des agents thérapeutiques prometteurs. Leur grand potentiel se heurte toutefois à des limitations majeures dont leur faible stabilité en milieu physiologique et la difficulté qu'ils ont à franchir les membranes biologiques. Au cours de ces dernières décennies, de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à la conception et à la synthèse d'oligonucléotides chimiquement modifiés afin de pallier ces limitations. La caractérisation de la stabilité et de la sélectivité d'appariement des oligonucléotides avec les acides nucléiques est indispensable dans le contexte de la mise au point d'outils diagnostiques et d'agents thérapeutiques basés sur ce type de molécules.

Après une brève présentation des applications potentielles des oligonucléotides modifiés, nous présentons différentes méthodes

physiques qui peuvent être utilisées pour caractériser la stabilité et la sélectivité d'appariement d'oligonucléotides. Un aperçu des résultats obtenus lors de l'étude d'un oligonucléotide chimiquement modifié de 11 bases est également présenté.

1.1. Oligonucléotides et thérapies géniques

Dans le noyau des cellules eucaryotes, la première étape de l'expression d'un gène est la transcription de la séquence de nucléotides d'ADN en une séquence de nucléotides d'ARN (ARN-prémessager) qui lui est complémentaire. Cette étape est suivie par une étape de maturation pour obtenir l'ARN-messager (ARN-m). La transmission de l'information génétique se termine, dans le cytoplasme, par la traduction de la séquence de nucléotides de l'ARN-m en la séquence d'acides aminés qui constituent le polypeptide exprimé par le gène. L'entière du processus est régie par différentes enzymes qui, via des interactions spécifiques avec les acides nucléiques, mènent à terme ces différentes étapes.

L'expression des gènes peut être régulée, dans un but thérapeutique, par l'interaction de différentes molécules avec les acides nucléiques. Les oligonucléotides possèdent dans ce contexte un potentiel élevé grâce à leur capacité à interagir de manière très spécifique avec les acides nucléiques. Si la séquence du gène que l'on désire inhiber est connue, il serait possible d'empêcher l'interaction entre l'acide nucléique correspondant et les enzymes responsables des différentes étapes de la transmission de l'information génétique en l'hybridant avec un brin d'oligonucléotide synthétique qui lui est complémentaire. Il est possible d'envisager deux stratégies thérapeutiques selon l'acide nucléique ciblé [1] (figure 1).

La première stratégie, appelée stratégie antigène, consiste en la conception d'un oligonucléotide apte à traverser les membranes plasmique et nucléaire des cellules et à s'hybrider avec une portion d'ADN afin d'en inhiber la transcription. Lors de l'interaction d'un oligonucléotide antigène avec la double hélice d'ADN, il y a localement formation soit d'une triple hélice d'acides nucléiques, soit d'une double hélice avec l'un des brins de l'ADN (ce type d'interaction est appelé 'invasion' de la double hélice). La triple hélice locale se forme lorsque l'oligonucléotide s'enroule dans le grand sillon de la double hélice d'ADN et forme des appariements, de Hoogsteen ou de Hoogsteen inverse, avec son brin complémentaire d'ADN. La formation de triples hélices nécessite la présence de cytosines protonées et d'une succession de bases puriques (A et G) sur l'un des brins de l'ADN et pyrimidiques (T et C) sur l'autre brin [2]. L'invasion quant à elle se produit via l'appariement Watson-Crick de l'oligonucléotide avec un simple brin d'ADN qui serait accessible, par exemple, lorsque

la double hélice d'ADN est partiellement déroulée en vue de sa réplication ou transcription. Dans les deux cas l'oligonucléotide antigène bloque, par encombrement stérique, l'action des différentes enzymes responsables de l'expression de l'information génétique.

La deuxième stratégie, appelée stratégie antisens, cible l'ARN-m. Celle-ci se base sur l'utilisation d'un oligonucléotide qui, après avoir traversé la membrane plasmique des cellules, s'apparie avec une portion d'ARN-m et inhibe sa traduction. L'interaction entre l'oligonucléotide antisens et l'ARN-m peut donner lieu à une double hélice locale via la formation d'appariements de Watson-Crick entre les bases azotées complémentaires de l'oligonucléotide et de l'ARN-m [3]. L'inhibition de la traduction résulte le plus souvent de l'activité de la ribonucléase H (RNase H), qui dégrade l'ARN qui est hybridé à l'ADN.

Pour chaque gène un individu ne possède que deux allèles, alors qu'il possède des milliers d'ARN-m provenant de leur transcription. La thérapie antisens a pour effet de bloquer la traduction des ARN-m en protéines sans pour autant bloquer la transcription des allèles en ARN-m. De ce fait, ces derniers continuent à être synthétisés et leur concentration dans le cytoplasme des cellules reste très élevée. Par contre, la thérapie antigène, qui inhibe la transcription des allèles en ARN-m, a pour effet de diminuer efficacement et à plus long terme la concentration en ARN-m dans les cellules.

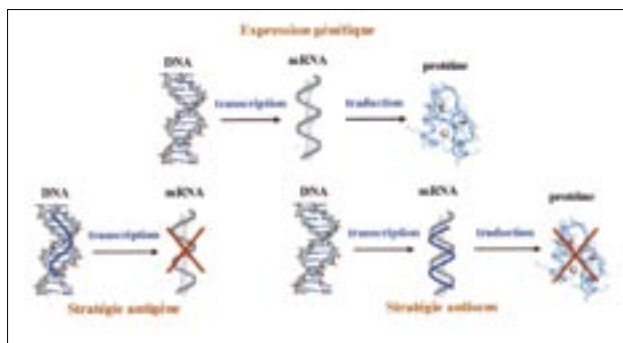


Figure 1: Schéma montrant les étapes principales de l'expression génétique ainsi que l'action d'un oligonucléotide antigène et d'un oligonucléotide antisens.

Les oligonucléotides naturels, c'est-à-dire constitués du même type de nucléotides que ceux présents dans les acides nucléiques des cellules (ADN ou ARN), traversent mal la membrane plasmique et ne sont malheureusement pas stables dans le milieu intracellulaire car ils sont rapidement dégradés par les nucléases. Pour pallier ces inconvénients, des oligonucléotides chimiquement modifiés ont récemment été développés. Ces derniers sont aussi conçus de manière à augmenter l'affinité et la spécificité d'interaction avec les acides nucléiques. Ils seront présentés et discutés plus en détail au point 1.3.

1.2. Oligonucléotides et outils diagnostiques du génome

Dans le cadre de la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et du traitement de maladies d'origine génétique, il est im-

portant de pouvoir diagnostiquer la présence de mutations pouvant mener à l'apparition d'une pathologie. Il y a dans ce contexte un intérêt croissant pour le diagnostic de 'Single Nucleotide Polymorphism' (SNP), caractérisé par des variations stables de la séquence d'ADN génomique, portant sur une seule base, affectant au moins 10% de la population. Les SNP qui se trouvent dans les régions codantes et dans les régions régulatrices des gènes peuvent être impliqués dans la prédisposition à certaines maladies. Le génotypage d'un SNP donné requiert une méthode hautement spécifique car il s'agit de faire une discrimination entre deux séquences d'ADN qui ne diffèrent que par une paire de bases. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour réaliser ce génotypage [4] dont celles qui font appel à la 'Polymerase Chain Reaction' (PCR).

La PCR est une méthode d'amplification *in vitro* de séquences d'ADN, rendue possible grâce à la découverte d'ADN-polymérase thermostables (comme la Taq polymérase) [5]. Le matériel de départ de la PCR est une solution d'ADN bicaténaire contenant la séquence nucléotidique que l'on désire amplifier à laquelle on ajoute la Taq polymérase, les quatre désoxynucléotides triphosphates et les amorces. Les amorces sont des oligonucléotides synthétiques qui sont complémentaires aux extrémités du segment d'ADN qui sera amplifié. Le processus de la PCR se déroule en trois étapes qui sont répétées un grand nombre de fois (figure 2). La première étape consiste en un chauffage rapide et bref de la solution afin de permettre la dénaturation de l'ADN bicaténaire. Elle est suivie par le refroidissement rapide de la solution pour que les amorces s'apparient avec les extrémités de la séquence ciblée à raison d'une amorce sur chaque brin. La dernière étape est la prolongation de l'amorce par la Taq polymérase. Ces opérations sont répétées plusieurs fois jusqu'à ce qu'on ait obtenu un nombre suffisant de réplifications de la séquence visée.

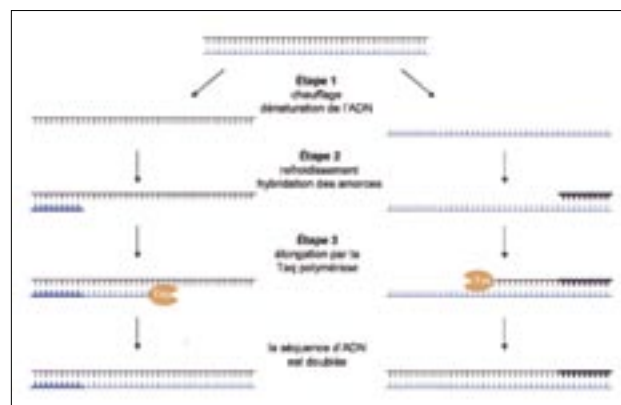


Figure 2: Schéma montrant les différentes étapes qui se produisent lors de l'amplification d'une séquence d'ADN par PCR (un cycle).

Il y a moyen de suivre en temps réel l'amplification PCR (real-time PCR) en utilisant, par exemple, un oligonucléotide (la sonde) marqué en 5' par un fluorophore et en 3' par un extincteur de fluorescence, conçu pour s'apparier avec une séquence se trouvant sur un des deux brins de l'ADN en aval de l'amorce [6]. Pendant la PCR, la sonde s'hybride avec le segment ciblé au même moment que l'amorce s'hybride avec l'extrémité du segment (figure 3). La proximité entre le fluorophore et son extincteur étant toujours maintenue, aucun changement significatif de fluorescence n'est observé. Lors de l'élongation du nouveau brin

à partir de l'amorce, la Taq polymérase, qui possède une activité exonucléase 5'→3', dégrade l'oligonucléotide se trouvant sur son passage. La dégradation de la sonde au cours de chaque passage de la Taq libère le fluorophore dans le mélange réactionnel et une augmentation de fluorescence est mesurée au cours de chaque cycle de PCR. L'intensité de fluorescence est directement proportionnelle au nombre de cycles d'amplification.

Un allèle spécifique, c'est-à-dire ayant une séquence qui présente un SNP spécifique, sera sélectivement amplifié si une des amorces est complémentaire à la partie d'ADN présentant le SNP. L'amorce s'apparie en effet préférentiellement à l'ADN qui lui est parfaitement complémentaire. Une autre approche d'identification de SNP consiste à utiliser plusieurs sondes lors de la real-time PCR, chacune ayant une séquence complémentaire à un allèle donné et chacune marquée par un fluorophore différent.

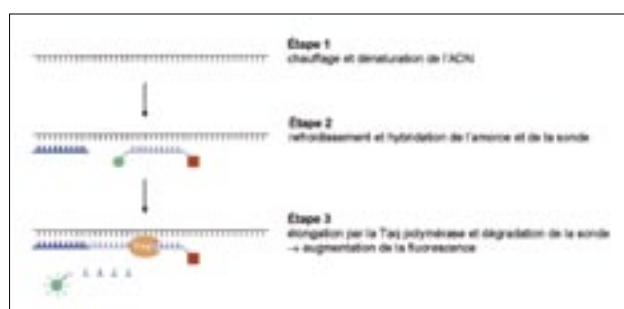


Figure 3: Schéma montrant l'action de la sonde dans un cycle de real-time PCR. Dans la figure sont montrées les étapes d'amplification relatives à un seul brin. Le fluorophore est représenté par un rond et le quencheur par un carré.

Des biosenseurs sont également exploitables pour la détection de SNP (puce à ADN). La conception d'un biosenseur consiste à fixer une sonde, un oligonucléotide dans ce cas, sur un support et à mettre cette surface en contact avec les différents allèles [7]. Le diagnostic se base sur la présence éventuelle d'une hybridation entre la sonde et un allèle. L'hybridation peut se détecter par la variation d'une propriété qui dépend de l'état monocaténaire ou bicaténaire de la sonde, tel que la variation de la fluorescence d'un fluorophore ancré préalablement à l'échantillon, la variation de propriétés électrochimiques ou la variation de propriétés de surface (figure 4).

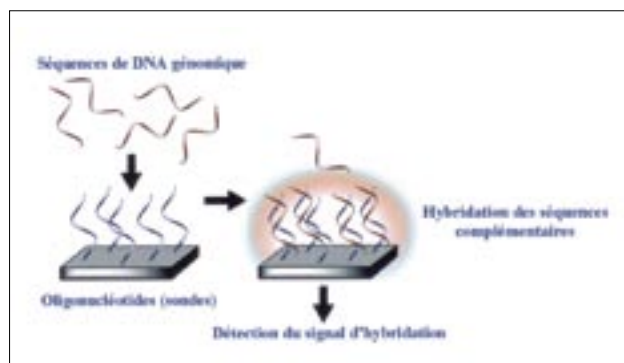


Figure 4: Schéma montrant les étapes principales impliquées dans l'utilisation des puces à ADN.

Dans le cadre de la détection de SNP, que ce soit en utilisant la PCR ou des puces à ADN, il est d'une importance primordiale que la reconnaissance entre oligonucléotides et acides nucléiques soit hautement sélective. Les oligonucléotides d'ADN ou d'ARN peuvent en effet s'hybrider même en présence d'un mésappariement (c'est-à-dire d'une paire de bases non complémentaires). La synthèse d'oligonucléotides chimiquement modifiés qui possèdent une affinité et une sélectivité d'appariement avec les acides nucléiques plus importantes que celles des oligonucléotides naturels pourraient donner lieu à des outils diagnostiques très intéressants.

1.3. Oligonucléotides chimiquement modifiés

À l'heure actuelle, plusieurs laboratoires de recherche s'intéressent à la conception, la synthèse et l'étude d'oligonucléotides chimiquement modifiés dans le but de trouver ceux qui possèdent les propriétés requises pour être utilisés efficacement à des fins thérapeutiques ou diagnostiques : solubilité en milieux aqueux, capacité à traverser les membranes des cellules, stabilité face à l'activité des nucléases, affinité et sélectivité très élevées lors de l'interaction avec les acides nucléiques.

De nombreux oligonucléotides chimiquement modifiés ont déjà été synthétisés et étudiés. À titre d'exemple, plusieurs études portent aujourd'hui sur les 'Locked Nucleic Acids' (LNA) [8] et les 'Peptide Nucleic Acids' (PNA) [9] (figure 5). Les LNA sont des analogues d'ADN dans lesquels un pont méthylène a été introduit entre le C2' et le C4' du sucre des nucléotides. De par la présence de ce pont, la conformation des sucres est 'bloquée' en C3'-endo, conformation adoptée préférentiellement par les sucres dans l'ARN. Ces oligonucléotides donnent des résultats prometteurs dans le domaine thérapeutique [10] et sont déjà employés dans quelques applications diagnostiques [11].

Les PNA sont des oligonucléotides dans lesquels le squelette sucre-phosphate a été remplacé par un squelette pseudo-peptidique achiral et neutre conçu de façon à ce qu'il maintienne les mêmes distances intra-bases et inter-brins que les oligonucléotides d'ADN ou d'ARN. Ces oligonucléotides possèdent une très grande affinité pour les acides nucléiques mais, d'un point de vue thérapeutique, leurs applications sont limitées. En effet, les PNA ne traversent pas les membranes cellulaires et sont peu solubles en milieu physiologique de par l'absence de groupes phosphate. Des chimères (succession de nucléotides d'ADN et de PNA liés entre eux), dont la solubilité est plus élevée, sont actuellement à l'étude [12]. Il a été montré que ces oligonucléotides chimères possèdent une bonne activité antisens [13]. Les PNA ont aussi un intérêt dans le cadre des recherches sur l'origine des acides nucléiques en tant que matériel génétique des organismes vivants [14].

Dans le cadre d'un traitement local de la rétinite à cytomégalovirus chez les patients atteints de SIDA, un oligonucléotide antisens chimiquement modifié a déjà été utilisé, le fomivirsen (commercialisé dans de nombreux pays sous le nom de Vitravene) [15]. Il s'agit d'un oligonucléotide où un atome d'oxygène du groupement phosphate a été remplacé par un atome de soufre, de séquence complémentaire à celle de l'ARN-m du cytomégalovirus de la rétinite. Administré par voie intravitréenne, il inhibe la réplication du cytomégalovirus en empêchant la synthèse d'un certain nombre de ses protéines.

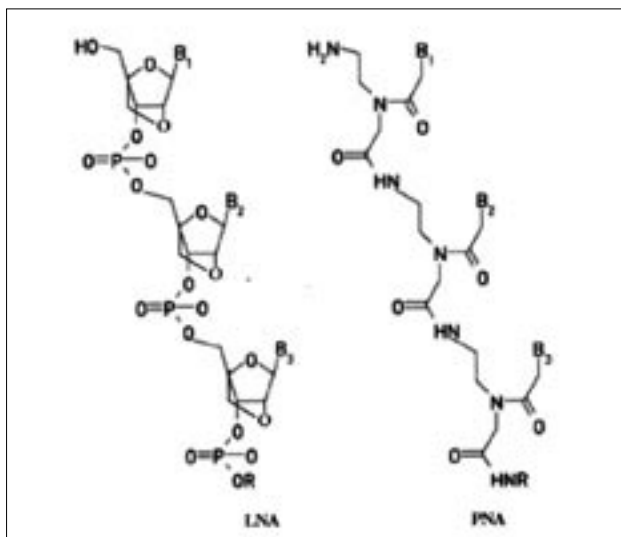


Figure 5: Polynucléotides de LNA et de PNA.

De nombreuses modifications chimiques existent ou sont imaginables pour les oligonucléotides mais il est important de cibler celles qui modifient de manière intéressante certaines propriétés des oligonucléotides. Comme cité plus haut, outre la nécessité de concevoir un oligonucléotide soluble en milieu physiologique, capable de traverser la membrane plasmique et résistant aux nucléases, il est important que ces oligonucléotides modifiés possèdent une grande affinité pour les acides nucléiques et une bonne sélectivité d'appariement. Afin d'aider à la conception d'oligonucléotides chimiquement modifiés qui pourraient avoir des applications thérapeutiques ou diagnostiques conséquentes, il est important de mieux comprendre les facteurs énergétiques à la base de la stabilisation des complexes qu'ils forment avec les acides nucléiques ainsi que de leur sélectivité d'appariement.

2. Méthodes d'étude de la stabilité et sélectivité d'appariement des oligonucléotides

Une des méthodes les plus répandues pour caractériser la stabilité de la structure double-brin d'oligonucléotides, naturels

ou chimiquement modifiés, est la mesure de la température de dénaturation, T_m , obtenue en dénaturant thermiquement l'oligonucléotide. La température de dénaturation est définie comme la température à laquelle 50% des paires de bases sont désappariées. Sa valeur dépend de la séquence des bases ; l'appariement G-C donne lieu à trois liens hydrogène entre brins tandis que l'appariement A-T donne lieu à deux liens hydrogène. T_m dépend aussi de la concentration en oligonucléotide ainsi que de la composition du tampon. Le phénomène de dénaturation thermique peut être suivi en mesurant toute propriété qui varie en fonction de l'état double-brin ou simple-brin des oligonucléotides. Il peut être étudié, entre autres, par spectroscopie d'absorption UV, résonance magnétique nucléaire (RMN) et calorimétrie différentielle à balayage (DSC). L'hypothèse faite dans ce genre d'étude est qu'une différence de T_m entre plusieurs oligonucléotides correspond à une différence de stabilité de leur structure double-brin, et donc à une différence d'affinité entre les deux brins, à toute température. La stabilité peut cependant être caractérisée d'une manière plus complète par calorimétrie à titrage isotherme (ITC).

La sélectivité d'appariement des oligonucléotides peut être étudiée par les mêmes méthodes qui permettent l'étude de la stabilité des oligonucléotides. En effet, afin de mettre en évidence la sélectivité d'appariement d'un certain oligonucléotide, il faut comparer les grandeurs thermodynamiques caractérisant la stabilité de l'oligonucléotide avec celles d'un oligonucléotide possédant la même séquence mais où un ou plusieurs mésappariements ont été introduits.

2.1. Spectroscopie d'absorption UV

L'expérience la plus simple à mettre en œuvre, et la plus répandue, pour déterminer T_m est le suivi de l'absorbance UV d'une solution d'oligonucléotide à une certaine longueur d'onde, en fonction de la température. L'empilement des paires de bases azotées au sein de la double hélice induit un effet hypochrome dû au couplage entre les moments dipolaires de transition des anneaux aromatiques des bases azotées. Il en résulte que la dénaturation d'un oligonucléotide s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance. La figure 6a montre la variation de l'absorbance mesurée en fonction de la température pour un oligonucléotide possédant 11 paires de bases.

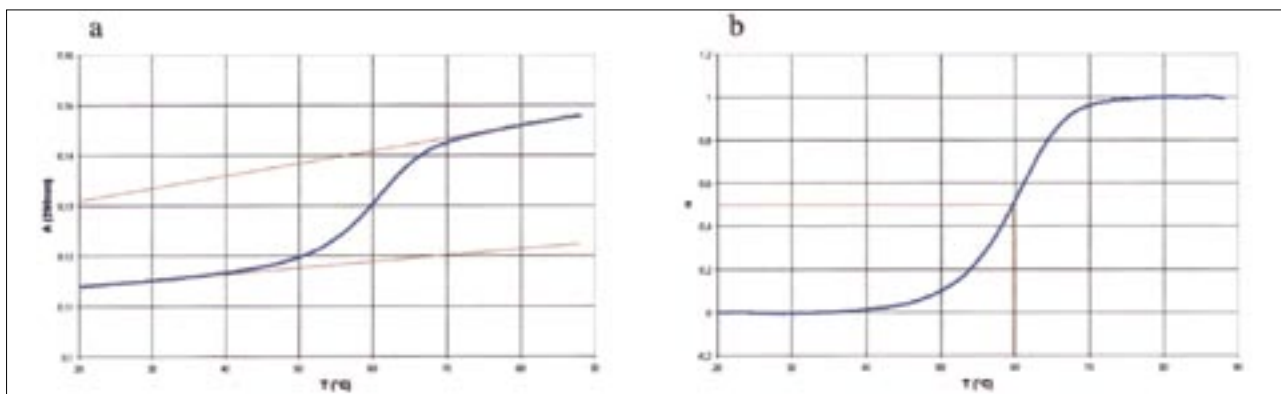


Figure 6a: Absorbance mesurée à 290 nm en fonction de la température pour une solution d'un oligonucléotide de 11 paires de bases. La vitesse de variation de la température est de 1°C/min et la concentration en oligonucléotide est de 10 μM. Les droites (rouges) représentent les extrapolations de A_{290} et de A_{260} à toute température.

Figure 6b : Fraction molaire (α) de l'oligonucléotide sous forme de simple brin en fonction de la température. La température à laquelle $\alpha = 0,5$ est la température de dénaturation.

Pour obtenir T_m à partir des données expérimentales il faut émettre l'hypothèse du modèle à deux états. Ce modèle stipule que, durant l'expérience, un oligonucléotide ne peut se trouver que soit entièrement sous forme de double-brin soit entièrement sous forme de simple-brin. Selon ce modèle, à chaque température l'absorbance observée est la moyenne entre l'absorbance de l'oligonucléotide sous forme de double-brin (A_{db}) et l'absorbance des simple-brins ($A_{sb1} + A_{sb2}$) pondérée par la fraction molaire des deux formes, respectivement $1-\alpha$ et α , ce qui donne :

$$A_{obs} = (1-\alpha)A_{db} + \alpha(A_{sb1} + A_{sb2}) \quad \text{équation 1}$$

À l'aide de cette dernière relation, il est possible de calculer la courbe $\alpha = f(T)$ à partir des données expérimentales, à condition de connaître, à chaque température, les valeurs de A_{db} et de $A_{sb1} + A_{sb2}$. Pour cela, il est courant d'extrapoler à toute température l'absorbance de l'oligonucléotide dans les deux formes, au départ des parties pré- et post-transitionnelles, en utilisant une relation linéaire (voir figure 6a).

La courbe $\alpha = f(T)$ ainsi obtenue permet de déterminer la température de dénaturation (figure 6b). Cette courbe permet également la détermination des paramètres thermodynamiques à T_m . En effet, à partir de la loi de Van't Hoff

$$\Delta H^\circ = RT^2 \frac{d \ln K}{dT} \quad \text{équation 2}$$

et de l'hypothèse du modèle à deux états

$$K = \frac{\alpha^2 C}{1-\alpha} \quad \text{équation 3}$$

on trouve la relation suivante :

$$\Delta H^\circ_{T_m} = 6RT_m^2 \left(\frac{d\alpha}{dT} \right)_{T_m} \quad \text{équation 4}$$

relation qui permet le calcul de l'enthalpie de dissociation des deux brins à la température de dénaturation. L'erreur sur la valeur du $\Delta H^\circ_{T_m}$ dépend de la précision de la courbe $\alpha = f(T)$ et est corrélée à l'erreur sur la valeur de T_m .

2.2. Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet également de suivre le processus de dénaturation thermique des oligonucléotides. Le spectre ^1H -RMN 1D d'un oligonucléotide présente des signaux caractéristiques des protons qui le constituent. Parmi ces protons, il existe des protons qui s'échangent avec ceux de l'eau (NH, OH) et des protons non échangeables avec ceux du solvant.

Lorsque les protons ne sont pas échangeables, la dénaturation thermique peut être suivie en observant la variation du déplacement chimique ou de l'intensité des signaux correspondants en fonction de la température. Les protons des groupements méthyles des thymines se situent dans une zone distincte du spectre et sont éloignés des autres signaux. Ces protons ont un déplacement chimique différent si l'oligonucléotide est sous forme double-brin (environnement A) ou désapparié (environnement B). Si l'échan-

ge entre ces deux environnements est rapide à l'échelle de temps de la RMN, on observe un seul signal pour ces protons dont le déplacement chimique, δ , est égal à la moyenne pondérée des déplacements chimiques des protons dans les deux environnements : $\delta = x_A \delta_A + x_B \delta_B$. Dans ce cas, on observera une variation du déplacement chimique du signal en fonction de la température. Si par contre l'échange entre les deux environnements est lent à l'échelle de temps de la RMN, on observe deux signaux, δ_A et δ_B , d'intensité proportionnelle à la fraction de protons dans chaque type d'environnement, x_A et x_B . Dans ce dernier cas, c'est l'intensité des signaux qui variera en fonction de la température. Dans les deux cas il est possible de tracer une courbe du paramètre (déplacement chimique ou intensité intégrée du signal) en fonction de la température et d'obtenir un profil $\alpha = f(T)$ semblable à celui que l'on obtient lors d'une expérience par spectroscopie d'absorption UV. L'analyse et l'interprétation des données se fait de la même manière, c'est-à-dire en faisant appel au modèle à deux états. Une expérience par RMN fournit les mêmes paramètres, T_m et $\Delta H^\circ_{T_m}$, que ceux obtenus par spectroscopie d'absorption UV, paramètres dont l'exactitude dépend de la validité du modèle à deux états et dont la précision dépend de la qualité des spectres RMN et de l'intégration des signaux.

L'observation des signaux des protons imino, qui sont échangeables avec ceux du solvant, permet d'obtenir des informations plus détaillées sur le processus de dénaturation thermique des oligonucléotides. Lors du chauffage d'une solution d'oligonucléotide, l'intensité des signaux des protons imino des thymines et des guanines est modifiée. En effet, les protons imino sont impliqués dans les liens hydrogène entre les bases azotées et, lorsque la température augmente, les paires de bases se désappariaient et ces protons s'échangent avec les protons de l'eau. Comme l'échange avec les protons de l'eau est rapide à l'échelle de temps de la RMN, leur signal se trouve déplacé sous le signal de l'eau. L'intensité des signaux des protons imino diminue donc au fur et à mesure que la température augmente et que l'oligonucléotide se dénature (figure 7).

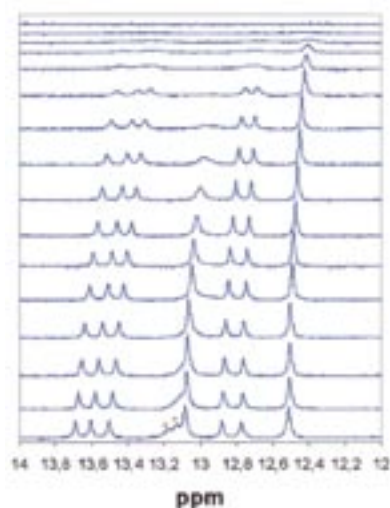


Figure 7: Spectres ^1H -RMN 1D d'un oligonucléotide de 11 paires de bases relevés en fonction de la température. Les spectres ont été relevés de 5 en 5 degrés et ceci entre 5°C (spectre du bas) et 80°C (spectre du haut). La zone représentée est celle des protons imino des thymines et des guanines. Les signaux marqués (*) sont ceux des paires de bases extrêmes qui disparaissent en premier lieu. La concentration en oligonucléotide est de 100 μM .

Chaque paire de bases d'un oligonucléotide double brin parfaitement complémentaire possède un proton imino impliqué dans un lien hydrogène. De ce fait, une analyse qualitative de la disparition des signaux des différents protons apporte de l'information sur la manière dont l'oligonucléotide se désapparie. Il est ainsi possible de vérifier la validité du modèle à deux états et de connaître la température en dessous de laquelle l'oligonucléotide est totalement apparié. Il faut cependant faire remarquer que les protons imino peuvent s'échanger avec ceux de l'eau même lorsque l'oligonucléotide se trouve sous forme de double-brin car la double hélice est dynamique et chaque paire de bases s'ouvre temporairement en permettant à ces protons de s'échanger avec ceux du solvant. Dans ce cas, ce n'est qu'une fraction de protons qui s'échange avec les protons de l'eau, fraction qui dépend des constantes cinétiques qui régissent l'ouverture temporaire des paires de bases. La présence d'une dynamique d'ouverture de paires de bases individuelles explique l'impossibilité de comparer la température de dénaturation, T_m , à la température de disparition des signaux des protons imino. La cinétique d'ouverture des paires de bases peut être caractérisée par RMN en mesurant, par des expériences de transfert d'aimantation, le temps d'échange des protons imino avec ceux de l'eau. Une série de mesures effectuées en fonction de la concentration en un catalyseur d'échange permet l'obtention de la durée de vie des paires de bases dans leurs deux états, fermé et ouvert [16].

2.3. Calorimétrie différentielle à balayage

Une transition structurale, induite par une augmentation de température, qui s'accompagne d'une variation d'enthalpie (ΔH°) non négligeable peut être suivie par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) en mesurant la variation de la capacité calorifique à pression constante (C_p) de la solution [17]. Dans ce type d'expérience, une cellule contenant l'échantillon et une cellule de référence contenant le solvant sont chauffées et refroidies en même temps, à une vitesse définie et constante. Le calorimètre mesure la différence de puissance nécessaire pour atteindre une même température dans les deux cellules. Lorsqu'un processus endothermique ou exothermique se manifeste dans une cellule, l'appareil mesure une différence de puissance qui est proportionnelle au C_p de l'échantillon. À partir de la courbe de la différence de puissance mesurée en fonction de la température, il est possible de déterminer la courbe $C_p = f(T)$ (figure 8).

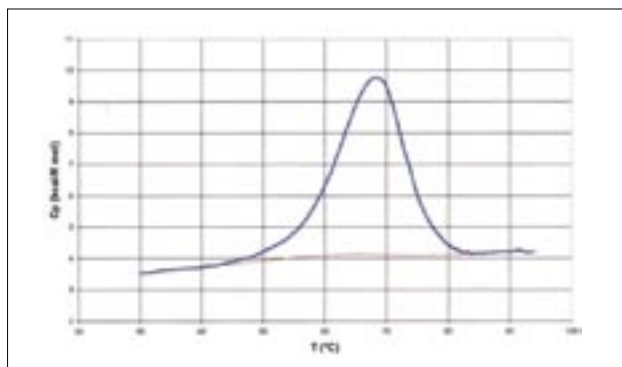


Figure 8: C_p d'une solution d'un oligonucléotide de 11 paires de bases en fonction de la température. La vitesse de variation de la température est de $1^\circ\text{C}/\text{min}$ et la concentration en oligonucléotide est de $100\ \mu\text{M}$. La courbe du bas (rouge) représente la ligne de base.

Il est possible de suivre la dénaturation thermique d'un oligonucléotide par DSC. Dans le thermogramme, l'aire sous le pic est égale à l'enthalpie libérée ou absorbée lors de la transition structurale, elle permet donc la détermination de $\Delta H^\circ_{T_m}$; la température à laquelle l'aire est divisée en deux correspond à T_m . Les paramètres, T_m et $\Delta H^\circ_{T_m}$, ainsi obtenus ne sont pas totalement affranchis de l'hypothèse du modèle à deux états car pour les déterminer il est nécessaire de construire une ligne de base qui est calculée à l'aide de l'extrapolation à toute température des parties pré- et post-transitionnelles et du modèle à deux états. Cependant, contrairement aux valeurs d'enthalpies obtenues par les deux méthodes précédentes, l'enthalpie obtenue par DSC est une mesure directe et n'est pas dérivée à l'aide de la relation de Van't Hoff.

2.4. Calorimétrie à titrage isotherme

Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, les études de dénaturation thermique ne permettent pas de caractériser, ni de comparer, la stabilité de différents oligonucléotides à d'autres températures que T_m . En effet, une température de dénaturation plus élevée ne reflète pas nécessairement une stabilité plus importante à température physiologique [18]. Il est donc intéressant de mesurer les paramètres thermodynamiques relatifs à l'interaction entre les deux brins à température physiologique. La calorimétrie à titrage isotherme (ITC) permet la mesure, en une seule expérience et à la température choisie, de la constante d'affinité, K_a , et du terme enthalpique, ΔH° , associés à l'interaction entre deux espèces [19]. À partir des valeurs de K_a et ΔH° obtenues il est possible de calculer le terme entropique lié à l'interaction et d'en obtenir ainsi une description thermodynamique complète :

$$\Delta S^\circ = \frac{\Delta H^\circ}{T} - R \ln K_a \quad \text{équation 5}$$

Une expérience ITC consiste en l'injection de petites quantités d'une solution contenant l'un des brins de l'oligonucléotide dans une cellule contenant une solution du brin complémentaire. Le calorimètre mesure, à chaque injection, la puissance qu'il doit fournir ou dissiper afin de maintenir la cellule de travail à la même température qu'une cellule de référence. Afin d'obtenir la valeur de la constante d'affinité il est nécessaire d'atteindre la saturation des brins se trouvant dans la cellule. La puissance mesurée par le calorimètre tout au long de l'expérience donne lieu à un thermogramme (figure 9a) où l'intégrale de chaque pic correspond, pour chaque injection, à la somme des chaleurs absorbées ou dégagées par tous les processus qui se déroulent dans la cellule (figure 9b). Plus précisément, l'intégrale des premiers pics correspond à la somme de la chaleur de dilution et de la chaleur dégagée ou absorbée lors de l'interaction entre les deux brins. L'intégrale des derniers pics correspond, si la saturation a bien été atteinte, uniquement à la chaleur de dilution du brin injecté. Les pics situés dans la zone de transition reflètent la saturation progressive du brin se trouvant dans la cellule.

Après soustraction de la chaleur de dilution aux données expérimentales, on obtient, grâce aux premières injections, la chaleur absorbée ou dégagée lors de l'interaction entre les deux brins, ΔH° . De plus, en ajustant un modèle d'interaction 1:1 aux données ainsi obtenues on peut obtenir la constante d'affinité, K_a , relative à l'interaction entre les deux brins.

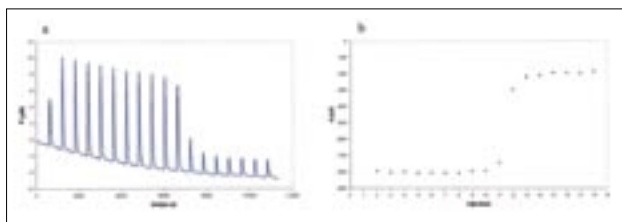


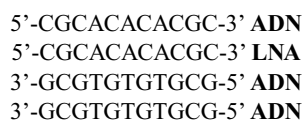
Figure 9a: Thermogramme ITC : puissance que l'appareil doit dissiper, lors d'injections de 5ml d'une solution d'un brin d'ADN 11-mère de concentration 200 μM dans 1.3ml d'une solution du brin complémentaire 10 μM , afin de maintenir la température de la cellule de travail égale à la température de la cellule de référence ($T=30^\circ\text{C}$).

Figure 9b: Chaleur dégagée par l'interaction d'un brin d'ADN 11-mère et de son brin complémentaire en fonction du nombre d'injections. (Le pic relatif à la première injection n'est pas intégré car il est entaché d'erreur à cause de phénomènes de diffusion des espèces qui ont lieu durant la stabilisation de l'appareil.)

Il existe des limites supérieure et inférieure pour les valeurs de K_a qui peuvent être déterminées précisément. Ceci est lié au fait que si la valeur de K_a est trop petite, l'interaction n'est pas totale lors des premières injections, ce qui ne permet pas la détermination du ΔH° . Par contre, si la valeur de K_a est trop grande, trop peu de points expérimentaux seront obtenus dans la zone de transition que pour pouvoir ajuster le modèle d'interaction aux données avec précision.

3. Étude de la stabilité d'un oligonucléotide chimiquement modifié

À titre d'exemple, nous présentons un aperçu de quelques résultats que nous avons obtenus lors de l'étude d'un oligonucléotide modifié. Dans notre laboratoire, nous nous intéressons à l'étude de la stabilité, de la sélectivité d'appariement et de la dynamique d'oligonucléotides présentant des nucléotides de LNA en comparaison avec les oligonucléotides d'ADN correspondants. Nous présentons ici des résultats relatifs aux oligonucléotides suivants :



Il s'agit d'oligonucléotides de même séquence, la différence réside uniquement dans la nature des nucléotides (LNA) d'un des brins dans un des oligonucléotides.

Leur stabilité a été, d'une part, étudiée par dénaturation thermique suivie par spectroscopie d'absorption UV, RMN et DSC et, d'autre part, étudiée à différentes températures par ITC. Pour les deux types d'oligonucléotides et pour chaque technique employée, les dénaturations thermiques ont été entreprises dans les mêmes conditions de concentration (100 μM en oligonucléotide) et de solvant (7,4mM Na_2HPO_4 , 2,4mM NaH_2PO_4 , 100mM NaCl, 0,1mM EDTA, pH7).

Les études de dénaturation thermique des deux oligonucléotides montrent que l'oligonucléotide chimiquement modifié possède une T_m d'environ 30°C supérieure à celle de l'oligonucléotide naturel. La T_m déterminée par spectroscopie d'absorption UV est systématiquement inférieure à celle obtenue par DSC.

En relevant des spectres ^1H -RMN à différentes températures, nous avons suivi plus en détails le désappariement des oligonucléotides. Les signaux des protons imino, protons échangeables, disparaissent progressivement lorsqu'on chauffe et que l'oligonucléotide se désapparie. Les deux oligonucléotides se désappariaient à partir des extrémités jusqu'aux paires de bases centrales. Ceci montre que le modèle à deux états n'est pas rigoureusement valable pour les deux oligonucléotides étudiés et pourrait expliquer des différences observées entre les valeurs de T_m obtenues par UV et DSC.

Nous avons effectué des expériences ITC afin de caractériser la thermodynamique d'appariement ADN-ADN et LNA-ADN à différentes températures comprises entre 15 et 37°C . Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'à toute température la constante d'affinité relative à l'appariement LNA-ADN est plus importante que celle relative à l'appariement ADN-ADN. Par contre l'interaction est plus exothermique pour l'oligonucléotide naturel que pour celui modifié. Ces observations permettent d'affirmer que l'origine de la stabilité plus importante de l'oligonucléotide modifié est entropique. Le terme entropique plus favorable pour le LNA-ADN par rapport à l'ADN-ADN pourrait s'expliquer par le fait que la conformation adoptée par le sucre dans les nucléotides LNA est 'bloquée' de telle sorte que les oligonucléotides LNA perdent moins d'entropie lors de l'appariement. Cela pourrait aussi s'expliquer par une dynamique différente de la structure double-brin du LNA-ADN par rapport à celle de l'ADN-ADN, ce qui serait dû au fait que la conformation des sucres dans les nucléotides LNA (C3'-endo) n'est pas celle adoptée préférentiellement par les sucres dans les nucléotides ADN (C2'-endo). Une troisième possibilité est une hydratation différente des oligonucléotides LNA par rapport aux oligonucléotides ADN, qui serait due à la présence d'un atome d'O supplémentaire dans le sucre des LNA (celui du pont méthylène).

Nous avons également étudié la sélectivité d'appariement de l'oligonucléotide hybride LNA-ADN en comparaison avec celle de l'oligonucléotide naturel ADN-ADN. Pour cela, et pour les deux systèmes, la stabilité de l'oligonucléotide parfaitement complémentaire a été comparée avec celle de différents oligonucléotides présentant un mésappariement au niveau de la base azotée centrale (T).

Les études de stabilité par dénaturation thermique montrent qu'il existe, entre l'oligonucléotide parfaitement complémentaire et les oligonucléotides mésappariés, une chute de T_m d'environ 13°C , indépendamment du mésappariement et de la nature, ADN ou LNA, des nucléotides.

Les études de stabilité par ITC des oligonucléotides présentant un mésappariement ont été entreprises à 25°C et à 37°C . À 25°C la constante d'affinité des oligonucléotides double-brins mésappariés est du même ordre de grandeur que celle de l'oligonucléotide double-brin parfaitement complémentaire correspondant (ADN-ADN et LNA-ADN). Par contre, à 37°C la constante

d'affinité des oligonucléotides double-brins mésappariés chute d'un ordre de grandeur par rapport à celle de l'oligonucléotide double-brin parfaitement complémentaire correspondant.

Nous n'observons pas de différences significatives entre la sélectivité de l'oligonucléotide ADN-ADN et celle de l'oligonucléotide hybride LNA-ADN. Il faut toutefois noter que les mésappariements ont été introduits dans une position centrale entre deux paires de bases G-C, qui est un appariement plus stable que l'appariement A-T, et dans un oligonucléotide présentant 8 paires G-C sur 11 paires de bases au total. L'influence du mésappariement sur la stabilité des oligonucléotides pourrait être réduite à cause de la position choisie et de la séquence étudiée.

Conclusions

Les oligonucléotides chimiquement modifiés ont du potentiel en tant qu'outils diagnostiques et agents thérapeutiques visant le génome. Dans ce contexte il est important de caractériser leur affinité et sélectivité d'appariement avec les acides nucléiques. Plusieurs méthodes physiques permettent d'atteindre ce but. La spectroscopie d'absorption UV permet l'obtention de la température de dénaturation, T_m , d'un oligonucléotide double-brin ainsi que des grandeurs thermodynamiques, à T_m , liés à la stabilité de l'oligonucléotide. L'exactitude de ces paramètres dépend cependant de la validité du modèle à deux états. La RMN, outre que l'obtention des mêmes paramètres fournis par une étude par UV,

permet de suivre plus en détail le processus de désappariement des oligonucléotides et permet également d'étudier la dynamique locale de leur structure en double hélice. La DSC fournit la T_m et le $\Delta H^\circ_{T_m}$ mais, contrairement aux deux premières méthodes d'étude, elle permet la mesure directe du terme enthalpique lié au désappariement des oligonucléotides. L'ITC fournit directement la constante d'affinité et le terme enthalpique liés à l'appariement entre deux brins d'un oligonucléotide. Les paramètres ainsi obtenus sont indépendants du modèle à deux états et peuvent être comparés avec ceux d'autres oligonucléotides car il est possible de les obtenir à toute température choisie. Ces différentes méthodes offrent des informations complémentaires quant à la stabilité de la structure double-brin des oligonucléotides et, en comparant la stabilité d'oligonucléotides présentant des mésappariements avec celle de l'oligonucléotide parfaitement complémentaire correspondant, permettent l'étude de la sélectivité d'appariement des oligonucléotides.

Remerciements

Les auteurs remercient Dr. Hakim El Housni (Service de Génétique Médicale, Erasme, ULB) et Prof. Karim Snoussi (Département de Chimie, UCL) pour les nombreuses discussions scientifiques. Ils remercient également Dr. Gilles Bruylants et Sophie Vandebussche pour la lecture critique du manuscrit. M.B. remercie le FRIA pour son support financier. Le laboratoire bénéficie d'un financement de la Communauté Française de Belgique (ARC 2002-2007).

Références

1. Y.S. Cho-Chung, A.M. Gewirtz, C.A. Stein in *Therapeutic oligonucleotides*. 2005, New York: The New York Academy of Sciences.
2. D. Praseuth, A.L. Guieysse, C. Hélène, *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1489, 181.
3. W.F. Lima, B.P. Monia, D.J. Ecker, S.M. Freier, *Biochemistry* **1992**, 31 (48), 12055.
4. B. Sobrino, M. Brión, A. Carracedo, *Forensic Science International* **2005**, 154, 181.
5. K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1986**, 51, 263.
6. P.M. Holland, R.D. Abramson, R. Watson, D.H. Gelfand, *P. N. A. S.* **1991**, 88, 7276.
7. S. Hahn, S. Mergenthaler, B. Zimmermann, W. Holzgreve, *Bioelectrochem.* **2005**, 67, 151.
8. A.A. Koshkin, P. Nielsen, M. Meldgaard, V.K. Rajwansi, S.K. Singh, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120 (50), 13252.
9. P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497.
10. K. Fluiter, A.L.M.A. ten Asbroek, M.B. de Wissel, M.E. Jakobs, M. Wissenbach, H. Olsson, O. Olsen, H. Oerum, F. Baas, *Nucleic Acids Research* **2003**, 31, 953.
11. P. Sidon, P. Heimann, F. Lambert, B. Dessars, V. Robin, H. El Housni, *Clinical Chemistry* **2006**, 52 (7), 1436.
12. P.J. Finn, N.J. Gibson, R. Fallon, A. Hamilton, T. Brown, *N. A. R.* **1996**, 24, 3357.
13. T. Shiraishi, P.E. Nielsen, *Nucleic Acids Research* **2004**, 32, 4893.
14. K.E. Nelson, M. Levy, S.L. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 3868.
15. R.F. Azad, V.B. Driver, K. Tanaka, R.M. Crooke, K.P. Anderson, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1993**, 37 (9), 1945.
16. M. Guéron, J.-L. Leroy, *Methods Enzymol.* **1995**, 261, 383.
17. J.E. Ladbury, B.Z. Chowdhry in *Biocalorimetry*. 1998, Chichester: J. Wiley & Sons Ltd.
18. P. Cahen, Thèse de Doctorat, ULB **2000**.
19. G. Bruylants, K. Bartik, *Chimie Nouvelle* **2005**, 23 (88), 9.