

Acides nucléiques modifiés comme outils en chémobiologie

Résumé L'ADN et l'ARN sont surtout connus pour leurs rôles dans le codage de l'information génétique et de support intermédiaire dans la synthèse de protéines. Toutefois, ces deux types de biopolymères sont couramment utilisés dans des applications qui dévient fortement de leurs fonctions biologiques principales. Cet article décrit succinctement les progrès en synthèse d'oligonucléotides et leurs versions modifiées et quelques applications en chémobiologie.

Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont des biopolymères dont l'importance biologique ne doit pas être soulignée davantage ici. Constitués de monomères appelés nucléotides – eux-mêmes formés d'un hétérocycle (nucléobase) et d'un sucre (2'-désoxyribose dans l'ADN et ribose dans l'ARN) –, rattachés par des liaisons phosphodiester, les acides nucléiques forment des chaînes qui peuvent adopter une structure en double hélice, comme c'est le cas pour l'ADN. L'importance biologique des acides nucléiques, leur nature chimique relativement simple, les règles de leur appariement clairement définies ainsi que leur capacité d'amplification enzymatique ont rapidement attiré l'attention en vue de leur application comme outils en chémobiologie, ainsi que pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Toutefois, les acides nucléiques naturels présentent certains inconvénients, comme une faible stabilité *in vivo* et un nombre très restreint de groupes fonctionnels capables d'intervenir dans des interactions avec des protéines ou d'autres biomolécules. Il n'est donc guère surprenant que la modification chimique des acides nucléiques ait pris son essor au début des années 1990. Dans cet article, les principales méthodes existantes ainsi que leurs bénéfices sont résumées succinctement en se concentrant particulièrement sur la modification d'une classe d'acides nucléiques appelés aptamères.

Les premières modifications chimiques visaient à façonner des oligonucléotides antisens (ASO) capables de contrôler la régulation et l'expression des gènes en bloquant spécifiquement des portions de l'ARN messager (figure 1).

En effet, les oligonucléotides ASO vont se lier spécifiquement à une séquence ARN messager cible et agir par le biais de deux mécanismes principaux :

- le duplex hybride formé entre l'ASO et l'ARN messager est reconnu par une enzyme de la famille des RNases H qui va

spécifiquement dégrader le brin ARN du duplex formé et de ce fait empêcher la traduction en protéine ;

- la présence de l'ASO sur l'ARN messager va bloquer la liaison et la reconnaissance par des complexes de protéines de liaison à l'ARN tels que les sous-unité ribosomales.

Toutefois, des oligonucléotides ASO composés d'ARN ou d'ADN naturels n'ont que peu d'utilité thérapeutique car ils ne pourront pas atteindre leurs cibles du fait de leur stabilité très restreinte dans des matrices biologiques. Afin d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques, il est nécessaire d'ajouter des modifications chimiques. Celles-ci permettront non seulement de stabiliser les ASO contre la dégradation par les nucléases, mais également de favoriser leur internalisation dans les cellules et/ou d'améliorer leur sélectivité pour leur cible ARN messager [1a].

De ce fait, de nombreuses modifications ont été introduites notamment au niveau du sucre (par exemple « locked nucleic acids » (LNA) et 2'-OMe, figure 2b), de la liaison phosphodiester (par exemple les phosphorothioates, figure 2c) et parfois même au niveau de la nucléobase (5-méthyl-2'-désoxycytosine 5-méthyl-dC, figure 2a). Ces stratégies ont permis de développer après une trentaine d'années de recherche neuf médicaments approuvés par la FDA dont l'ASO nusinersen (Spinraza) pour le traitement de la maladie rare amyotrophie spinale antérieure [1b].

La stratégie antisens a été rejointe par d'autres approches thérapeutiques visant à contrôler l'expression des gènes comme les ARN interférents ou la technologie Crispr-Cas 9, ce qui a conduit à un fort développement de la chimie des acides nucléiques. Plus récemment, l'ajout de nucléotides modifiés tels que la N1-méthylpseudouridine (figure 3) dans les vaccins à ARN messager a permis d'améliorer leur traduction en protéine cible tout en réduisant leur immunogénicité [2].

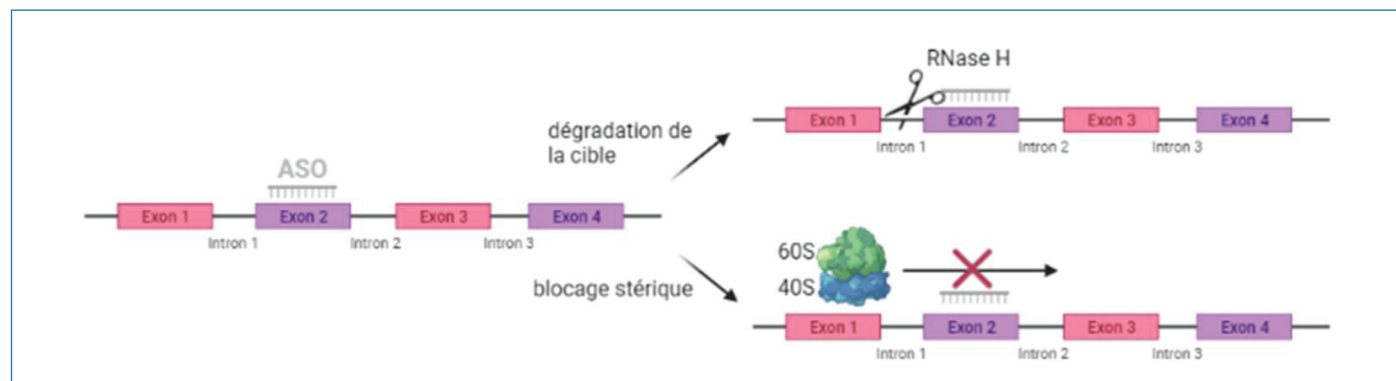


Figure 1 - Principes et mécanismes d'action d'oligonucléotides thérapeutiques du type antisens (ASO). Une fois que l'ASO s'est apparié à sa cible ARN messager par formation de paires de base Watson-Crick, il peut induire une dégradation de la cible par le biais du recrutement d'enzymes de la famille des RNases H ou bloquer la synthèse peptidique par blocage stérique.

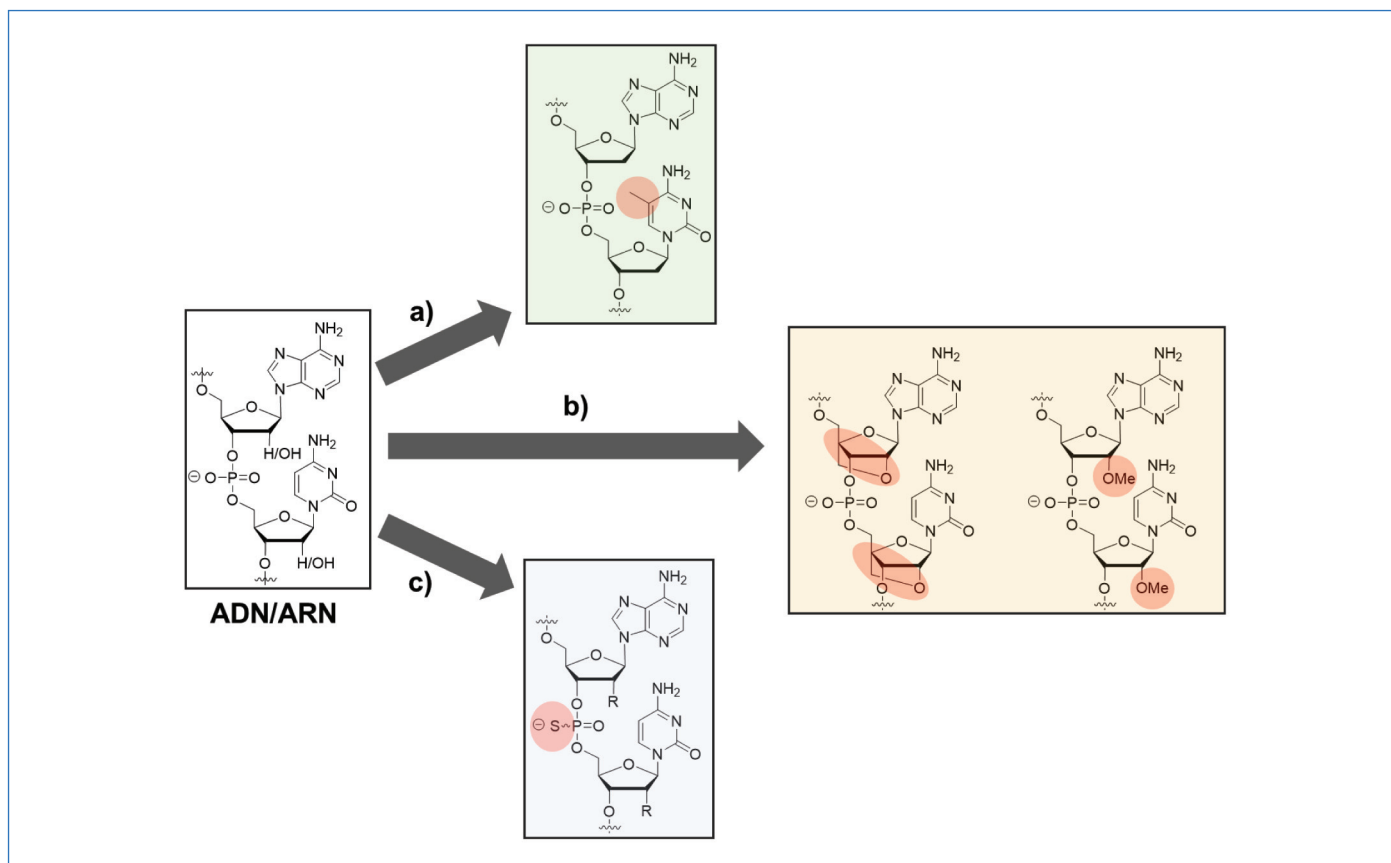


Figure 2 - Modification chimique des acides nucléiques pour augmenter leur biostabilité et leur capacité à agir en tant qu'agent antisens. Modification a) de la nucléobase (5-méthyl-dC), b) du sucre (LNA et 2'-OMe, respectivement), et c) de la liaison phosphodiester (phosphorothioates).

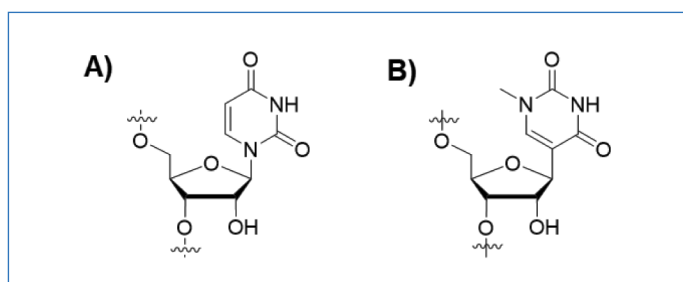


Figure 3 - Structures chimiques de A) l'uridine et B) la N1-méthylpseudouridine.

Bien que la modification chimique des acides nucléiques soit née dans le cadre du développement de nouveaux agents thérapeutiques, cette stratégie a été largement appliquée à d'autres types d'oligonucléotides, ce qui a permis d'étendre le champ d'applications de l'ADN et de l'ARN à des domaines tels que les tests de diagnostics et bio-analytiques, la construction de nanostructures, ou même la catalyse chimique.

La synthèse d'acides nucléiques modifiés peut se faire de manière chimique en utilisant des monomères activés (phosphoramidites) dans des procédés automatisés de synthèse sur support solide, ou par des méthodes chimio-enzymatiques impliquant des nucléosides triphosphates modifiés. Cette dernière technique de polymérisation de nucléotides triphosphates (éventuellement modifiés) permet d'accéder à des séquences sans réelle limitation de longueur ainsi qu'à des techniques de sélection *in vitro* de type SELEX (« systematic evolution of ligands by exponential enrichment »). Cette méthode d'évolution moléculaire est particulièrement intéressante car elle permet de cribler des milliers

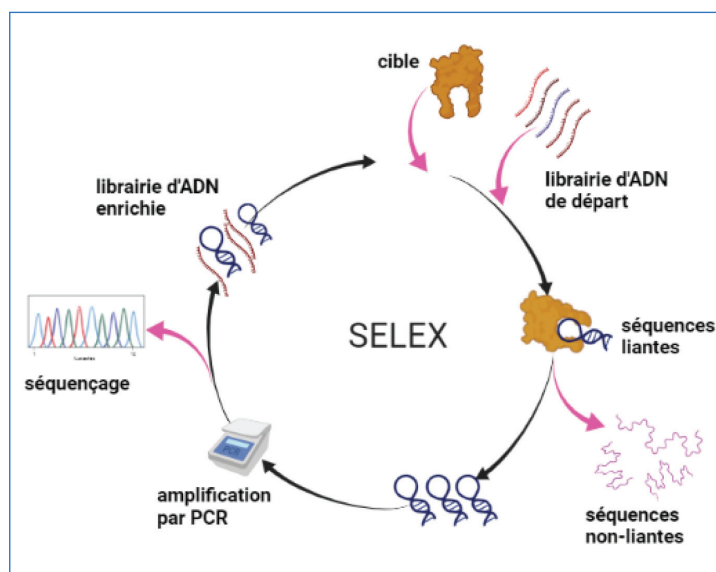


Figure 4 - Représentation schématique du fonctionnement de la technique SELEX. Une librairie d'ADN est incubée avec la cible d'intérêt. Après séparation, les séquences non liantes sont éliminées et les séquences capables de se lier à la cible sont récupérées et amplifiées par PCR. La librairie enrichie en séquences liantes est ensuite soit utilisée dans des cycles de SELEX additionnels ou directement séquencée.

de molécules d'acides nucléiques (typiquement de l'ordre de 10^{13} molécules individuelles) simultanément pour leur capacité à se lier à des cibles d'intérêt (figure 4). Les molécules qui sont isolées à la fin de ce criblage sont appelées aptamères et sont donc des molécules d'ADN ou d'ARN (simple brin) capables de se lier à des cibles avec haute spécificité et affinité [3].

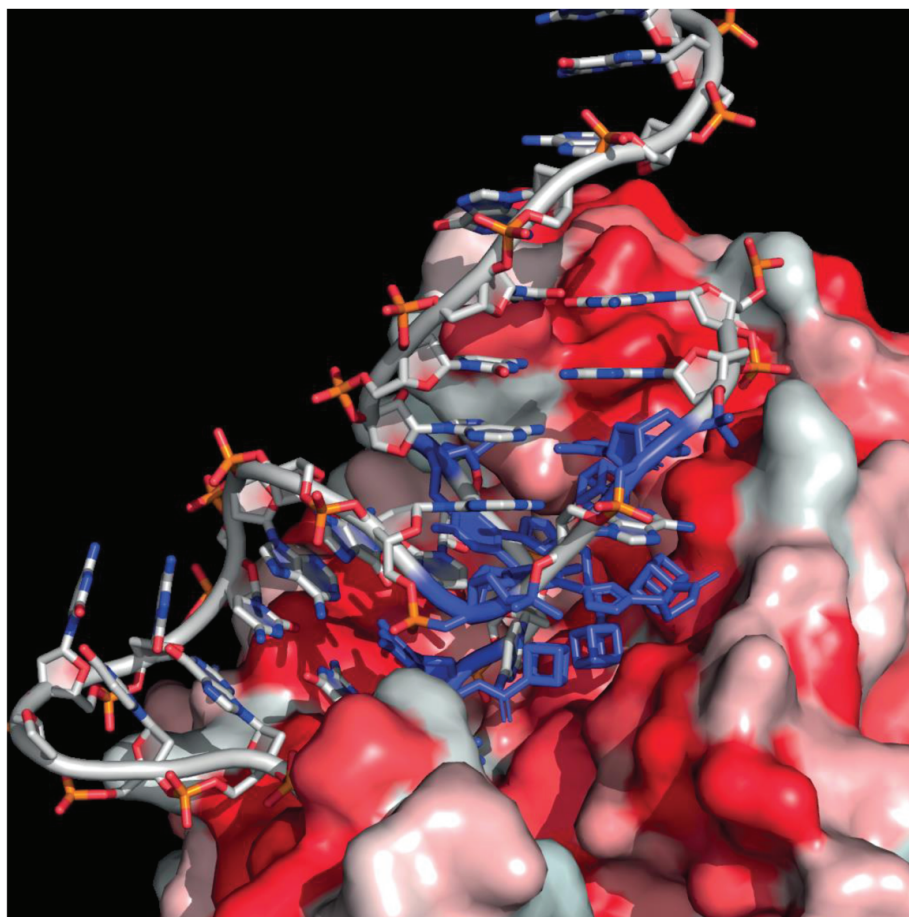


Figure 5 - Structure RX de l'aptamère modifié avec des entités cubane capable de se lier à la lactate déshydrogénase de *P. vivax*, un biomarqueur du paludisme.

Les aptamères, souvent considérés comme l'équivalent des anticorps, ont trouvé de nombreuses applications, surtout pour le développement de tests de diagnostic et d'agents thérapeutiques. Ils sont utilisés par exemple dans des plateformes protéomiques pour la détection de biomarqueurs de maladies dans le sérum ou le plasma humain [4], ainsi que dans des tests de diagnostic pour la détection de virus tels que le SARS-CoV-2 [5]. Comme pour d'autres oligonucléotides thérapeutiques, l'incorporation de groupes fonctionnels par le biais de nucléotides triphosphates modifiés permet d'accroître la stabilité et le temps de résidence des aptamères, mais également leur capacité à se lier à des cibles auxquelles les aptamères naturels ne peuvent pas se fixer telles que les glycoprotéines ou les protéines présentant de faibles points iso-électriques ($\text{pH} < 7$) [6].

Dans notre groupe de recherche, nous suivons cette approche pour générer des aptamères modifiés en vue de leur application dans le domaine du diagnostic, de la thérapie ciblée, ainsi que de la création de biocapteurs. Dans un exemple récent qui illustre parfaitement cette stratégie, nous avons employé des nucléotides équipés d'unité cubane, un isostère du benzène, pour isoler un aptamère capable de se lier avec haute spécificité à un biomarqueur du paludisme pour le développement de tests de diagnostics pour la détection de cette maladie infectieuse (figure 5) [7]. Cet aptamère est non seulement capable de reconnaître la protéine cible, à savoir la lactate déshydrogénase du parasite *P. vivax*, mais la distingue de celle de *P. falciparum* malgré une forte homologie de séquence. Cette haute spécificité résulte de la formation

d'une poche hydrophobe créée par quatre résidus cubane capable d'interagir directement avec un exosite particulier de la protéine combiné avec la formation d'un pont hydrogène $\text{C-H}\cdots\text{O}$ entre un carbonyle d'un acide aminé avec une liaison C-H d'une unité cubane [7].

La modification chimique des acides nucléiques est une stratégie versatile qui permet d'améliorer les propriétés biologiques et fonctionnelles de l'ADN et de l'ARN. Initialement conçue pour développer des agents thérapeutiques à base d'oligonucléotides, notamment les ASO, cette méthode s'est rapidement propagée à d'autres types d'oligonucléotides tels que les aptamères en vue de leur utilisation dans de nombreuses et diverses applications. Il est prévisible que cette méthode se propagera à de nouveaux domaines comme le stockage d'informations dans l'ADN, la synthèse enzymatique contrôlée, l'amélioration de l'efficacité et de la stabilité de vaccins ARN messagers, la création des nouveaux outils pour la chimobiologie, ou la mise au point de tests de diagnostic ou des méthodes de séparation.

- [1] a) Q. Laurent, R. Martinet, D. Moreau, N. Winssinger, N. Sakai, S. Matile, Oligonucleotide phosphorothioates enter cells by thiol-mediated uptake, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60, p. 19102-106; b) S.T. Crooke, P.P. Seth, T.A. Vickers, X.-H. Liang, The interaction of phosphorothioate-containing RNA targeted drugs with proteins is a critical determinant of the therapeutic effects of these agents, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, p. 14754-771.
- [2] K.D. Nance, J.L. Meier, Modifications in an emergency: the role of N1-methylpseudouridine in COVID-19 vaccines, *ACS Cent. Sci.*, **2021**, 7, p. 748-756.
- [3] M. Debais, A. Lelièvre, M. Smietana, S. Müller, Splitting aptamers and nucleic acid enzymes for the development of advanced biosensors, *Nucleic Acids Res.*, **2020**, 48, p. 3400-422.
- [4] B.B. Sun *et al.*, Genomic atlas of the human plasma proteome, *Nature*, **2018**, 558, p. 73-79.
- [5] Z. Zhang, L. Soleymani, J.D. Brennan, Y. Li *et al.*, High affinity dimeric aptamers enable rapid electrochemical detection of wild-type and B.1.1.7 SARS-CoV-2 in unprocessed saliva, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60, p. 24266-274; A. Schmitz, M. Famulok, G. Mayer *et al.*, A SARS-CoV-2 spike binding DNA aptamer that inhibits pseudovirus infection by an RBD-independent mechanism, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60, p. 10279-285.
- [6] L.K. McKenzie, R. El-Khoury, J.D. Thorpe, M.J. Damha, M. Hollenstein, Recent progress in non-native nucleic acid modifications, *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, 50, p. 5126-164.
- [7] Y.-W. Cheung *et al.*, Evolution of abiotic cubane chemistries in a nucleic acid aptamer allows selective recognition of a malaria biomarker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2020**, 117, p. 16790-798.

Marcel HOLLENSTEIN,

Chargé de recherche expert, Département de Biologie structurale et chimie, Institut Pasteur, Paris.

* marcel.hollenstein@pasteur.fr