

Auto-assemblage dynamique de clusters cationiques pour la complexation et la vectorisation d'acides nucléiques

Eline Bartolami, Sébastien Ulrich et Pascal Dumy

Résumé La reconnaissance non covalente de biomolécules s'opère souvent par une combinaison d'interactions qui permet de compenser la faiblesse de chacune des interactions prises individuellement. Ce phénomène de multivalence est aujourd'hui très exploité pour concevoir des systèmes artificiels de reconnaissance de biomolécules, en particulier des clusters cationiques pour la complexation et la vectorisation d'acides nucléiques. Dans les travaux réalisés au cours de cette thèse, a été exploitée une approche basée sur l'auto-assemblage par chimie covalente dynamique pour générer des systèmes cationiques multivalents reconnaissant efficacement des oligonucléotides. Cette méthodologie originale permet de conférer des caractéristiques intéressantes d'adaptation du système à la cible biologique ainsi qu'à des stimuli chimiques, et a permis d'identifier un cluster actif pour la vectorisation d'acides nucléiques au sein de cellules vivantes.

Mots-clés **Multivalence, cluster cationique, auto-assemblage, chimie covalente dynamique, complexation d'acide nucléique.**

Abstract **Dynamic self-assembly of cationic clusters for nucleic acids complexation and vectorization**
The non-covalent recognition of biomolecules often takes place through a combination of interactions that compensate the weakness of these interactions when taken individually. This phenomenon of multivalency is nowadays commonly used to design artificial systems for the recognition of biomolecules, for instance cationic clusters for the complexation and transport of nucleic acids. In this PhD thesis work, an approach has been exploited based on self-assembly using dynamic covalent chemistry for generating multivalent cationic clusters that effectively recognize oligonucleotides. This novel method endows the system with interesting features such as its adaption to the biological target and its responsiveness to chemical stimuli. Moreover, a bioactive cluster capable of transfecting nucleic acid in living cells has been successfully identified.

Keywords **Multivalency, cationic cluster, self-assembly, dynamic covalent chemistry, nucleic acid complexation.**

Introduction

La multivalence et son rôle dans la reconnaissance des biomolécules

Les interactions non covalentes multiples, dénommées multivalence [1], sont très communément employées dans les mécanismes biologiques de reconnaissance en milieu aqueux. Par exemple, les infections virales ou encore l'adhésion sur une surface cellulaire sont l'œuvre d'une combinaison d'interactions non covalentes mettant en jeu de multiples sites de reconnaissance. Ce nombre important de contacts entre deux systèmes donnés permet de compenser la faible force de chaque interaction non covalente prise indépendamment. Ainsi, la multivalence joue un rôle clé dans l'affinité et la sélectivité d'une biomolécule pour sa cible.

Ces dernières années, divers systèmes multivalents synthétiques – appelés « clusters » – ont été conçus comme mimes de systèmes naturels pouvant interagir efficacement avec la biomolécule cible en milieu aqueux. Des clusters fonctionnalisés avec des ligands glycosidiques (glyco-clusters) ont, par exemple, été étudiés pour leur rôle dans la reconnaissance des protéines de type lectines [2] qui

peuvent être impliquées dans les réponses immunitaires et infectieuses (figure 1).

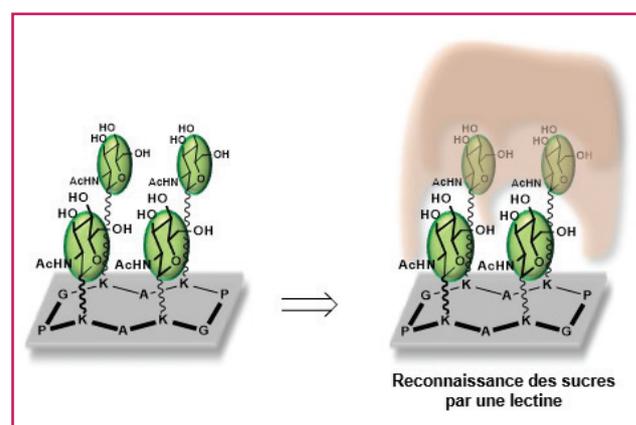


Figure 1 - Glycocluster impliqué dans la reconnaissance des lectines par le biais d'interactions multivalentes non covalentes entre les unités glycosidiques du cluster et les sites de reconnaissance d'une lectine tétramérique. Avec A : L-alanine ; K : L-lysine ; P : L-proline ; G : glycine.

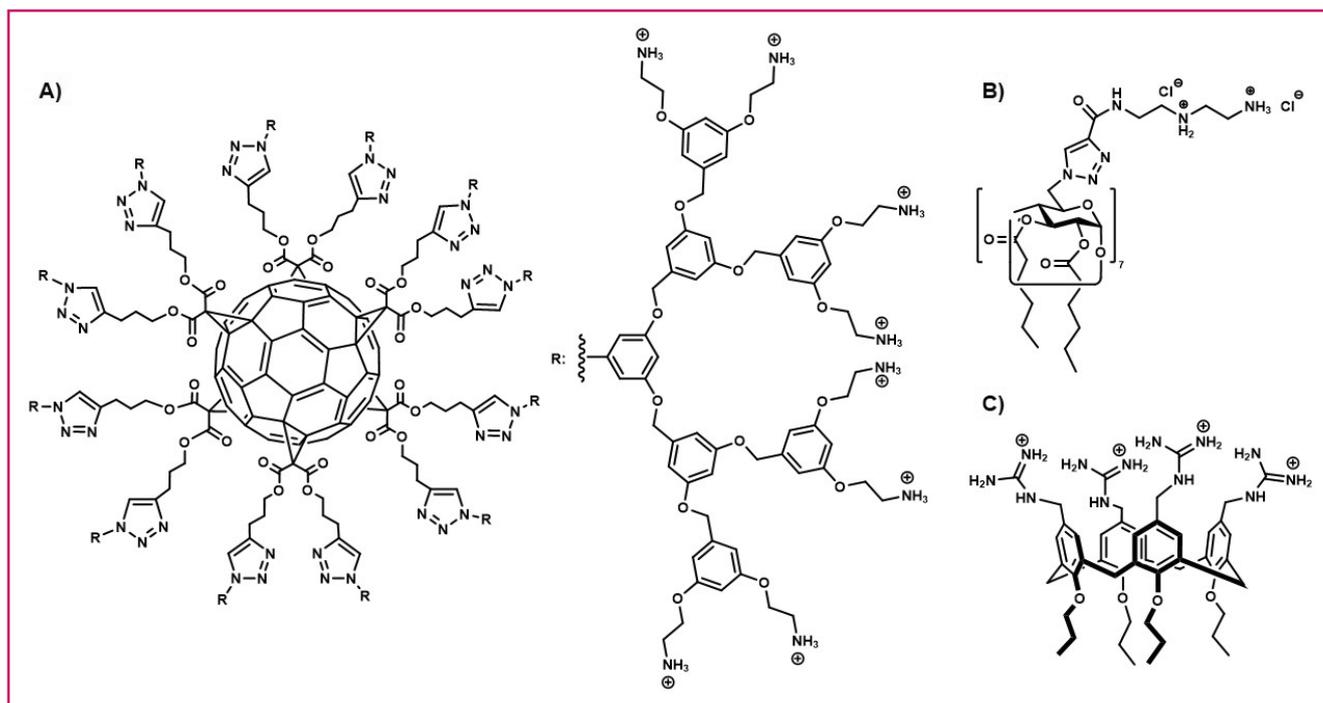


Figure 2 - Clusters cationiques conçus à partir de plateformes A) fullerène, B) cyclodextrine et C) calixarène.

Clusters cationiques pour la complexation et la vectorisation d'acides nucléiques

Les clusters cationiques sont quant à eux très utilisés pour la reconnaissance de biomolécules chargées négativement, comme par exemple les acides nucléiques. Les nucléosomes [3], par exemple, sont des clusters cationiques de protéines qui sont impliqués dans la compaction de notre génome. Les clusters cationiques de synthèse peuvent également trouver des applications pour la vectorisation d'acides nucléiques thérapeutiques. Ainsi, différents clusters cationiques ont été récemment préparés par chimie de liaison click [4]. Différents types de plateformes de faibles poids moléculaires ont été fonctionnalisées – fullerènes [5], cyclodextrines [6], calixarènes [7] (figure 2) – et ont permis d'accéder à différentes valences. Il a été montré que ces clusters sont capables de complexer efficacement et de transporter des oligonucléotides au sein de cellules.

Objectif : génération de clusters cationiques par auto-assemblage

Intérêt et motivations : quels seraient les avantages d'une approche par auto-assemblage ?

Bien que les systèmes décrits ci-dessus soient très intéressants, leur préparation et leur isolation peuvent être fastidieuses. De plus, la structure impactant grandement l'efficacité de reconnaissance des acides nucléiques, il est souvent nécessaire de préparer un grand nombre de composés pour en identifier un qui soit actif. Ainsi, il peut être très intéressant d'appliquer une approche d'auto-assemblage qui permette au système de s'organiser spontanément et peut-être d'adopter une structure qui soit la mieux adaptée à l'interaction avec la cible biologique.

État de l'art : systèmes auto-assemblés par interactions supramoléculaires

La multivalence supramoléculaire peut être obtenue à partir d'interactions hydrophobes entraînant la formation d'agrégats. Ainsi, certains systèmes amphiphiles, composés d'une partie hydrophile et d'une autre hydrophobe, se sont avérés être de meilleurs agents de vectorisation (figure 3). En effet, alors que les chaînes cationiques hydrophiles sont essentielles à la solubilité en milieu aqueux ainsi qu'à la complexation avec les oligonucléotides, la tête hydrophobe permet de favoriser la traversée de la membrane cellulaire et surtout d'organiser ces petites molécules en agrégats multivalents [8].

Clusters cationiques générés par chimie covalente dynamique

La chimie covalente dynamique consiste en l'utilisation de réactions réversibles pour générer des systèmes sous contrôle thermodynamique [9]. Cette approche a été récemment exploitée pour générer divers types de polymères

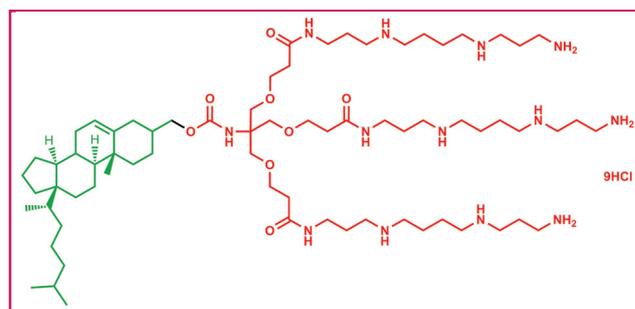


Figure 3 - Dendrimère amphiphile stabilisé par auto-assemblage via des interactions hydrophobes avec une tête hydrophobe (vert) et des chaînes hydrophiles (rouge).

dynamiques covalents pour des applications biologiques [10-12]. Dans ce projet, nous avons utilisé cette stratégie d'auto-assemblage covalent et l'avons appliqué à la génération de clusters cationiques pour la complexation et la vectorisation d'acides nucléiques. Nous avons ainsi sélectionné une plateforme peptidique – déjà largement exploitée du fait de sa haute pré-organisation pour la conception de systèmes multivalents de reconnaissance de biomolécules – et des ligands dérivés d'acides aminés et/ou de peptides fonctionnalisés. La méthodologie d'auto-assemblage covalent repose sur la formation de liaisons acylhydrazone. Cette réaction présente certains avantages clés pour ce projet : 1) elle se produit en milieu aqueux ; 2) elle est chimiosélective, ce qui permet de l'utiliser en présence de biomolécules ; 3) elle est réversible dans des conditions douces. Ainsi nous avons montré qu'il est en effet possible de générer des clusters (tétravalents en l'occurrence), en milieu aqueux, par simple mélange d'une plateforme portant des groupes aldéhyde et de ligands portant des fonctions hydrazide. Nous avons ensuite eu le plaisir d'observer que lorsque le ligand est un dérivé d'arginine – portant ainsi un groupe cationique guanidinium –, le cluster correspondant complexe efficacement un ADN double brin (tests par déplacement du bromure d'éthidium, électrophorèse sur gel, titration calorimétrique isotherme). L'originalité de notre approche réside dans la possibilité de réaliser cette opération d'auto-assemblage en « one pot » en présence de la cible. Les différents constituants ont successivement été additionnés dans le réacteur en milieu tamponné aqueux à pH 5,0. Lors de la réalisation de cette expérience, nous avons observé la complexation en temps réel de l'oligonucléotide cible, qui est donc le résultat de l'auto-assemblage programmé du ligand monovalent sur la plateforme peptidique. Ainsi, à partir d'un mélange de fragments inactifs (plateformes neutres, ligands monovalents), le système exprime spontanément un cluster multivalent qui est lui actif vis-à-vis de la complexation d'ADN (*figure 4*) [13].

Les propriétés réversibles des liaisons mises en jeu dans la formation de ces clusters leur confèrent un caractère dynamique. Souhaitant étudier cet aspect, nous avons ainsi conçu une bibliothèque combinatoire dynamique minimaliste constituée de deux ligands différents – un neutre et un cationique – en compétition pour la même plateforme. En

l'absence d'ADN, nous avons montré que cette bibliothèque est biaisée vers la formation de clusters neutres qui sont inactifs pour la complexation d'ADN. En présence d'ADN, la bibliothèque révèle une faible capacité à complexer l'ADN, ce qui paraît évident étant donné qu'elle est principalement composée de constituants inactifs. Par contre, nous avons eu l'heureuse surprise d'observer que l'activité de cette bibliothèque augmentait avec le temps. La conclusion de nombreuses expériences nous permet d'affirmer que ceci est dû à l'adaptation de la bibliothèque à la présence d'ADN. Ce phénomène se traduit par une sélection des ligands cationiques, induit par la présence de l'ADN, pour ainsi générer les clusters les plus aptes à interagir avec cette cible. Ainsi, en présence de la biomolécule cible, la formation du cluster cationique est favorisée au dépend de celle du système neutre. Cette propriété pourrait être mise à profit pour identifier des agents de complexation d'ADN taillés sur mesure par la cible elle-même (*figure 5*).

Outre cette possibilité que la cible guide la formation du cluster le plus actif, nous nous sommes intéressés à la possibilité d'imposer un changement constitutionnel au sein de la bibliothèque. Ainsi, nous avons démontré que l'ajout de méthoxyamine permet, à pH 5,0 sur une durée de 24 h, de convertir quantitativement tous les clusters acylhydrazone en clusters oxime, ces derniers étant thermodynamiquement plus stables. Lorsque cette opération est réalisée sur le complexe cluster-ADN, l'expérience montre que ceci déclenche la décompaction et le relargage de l'ADN double brin (*figure 6*). L'échange dirigé de ligand par chimie covalente dynamique permet donc le contrôle de la décomplexation de l'oligonucléotide par un effecteur chimique aussi simple que la méthoxyamine.

Application et identification de vecteurs d'acides nucléiques

Enfin, nous avons mis à profit la méthodologie d'auto-assemblage *in situ* pour réaliser un criblage de fragments (différents plateformes, différents ligands) dans un format de plaque 96 puits avec détection par fluorescence. Ceci a permis de rapidement cribler différentes modifications structurales (valence, nature et chiralité des ligands, pré-organisation de la plateforme) sur la complexation d'oligonucléotides [14].

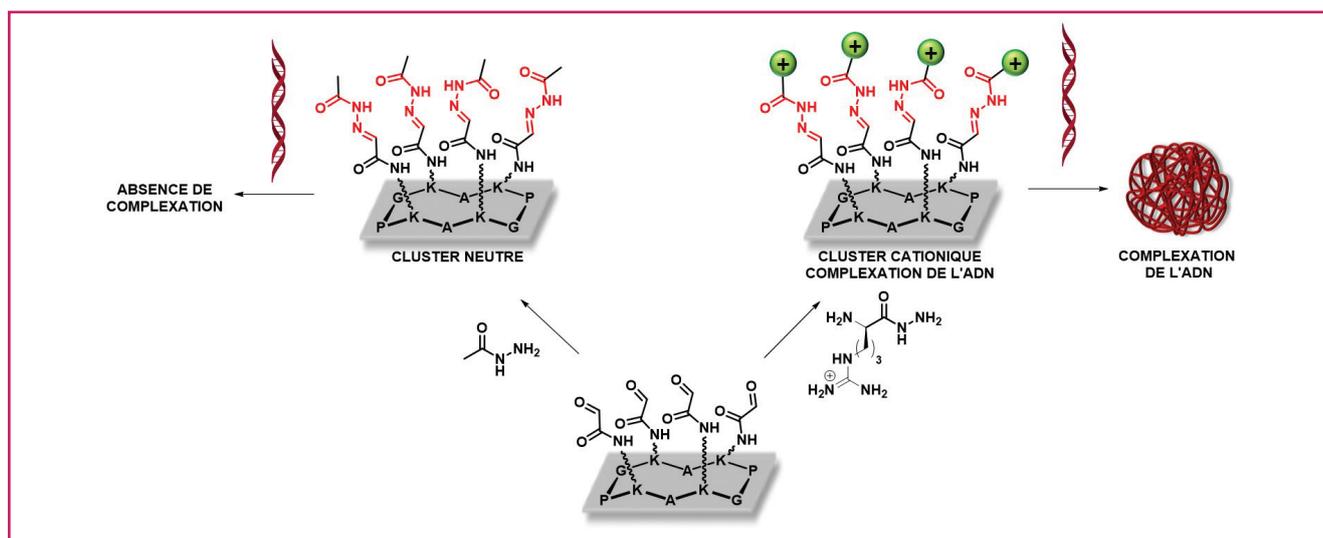


Figure 4 - Multimérisation programmée d'acides aminés modifiés *via* la formation de liaisons acylhydrazone en milieu aqueux et complexation *in situ* d'ADN induite par l'expression d'un cluster cationique.

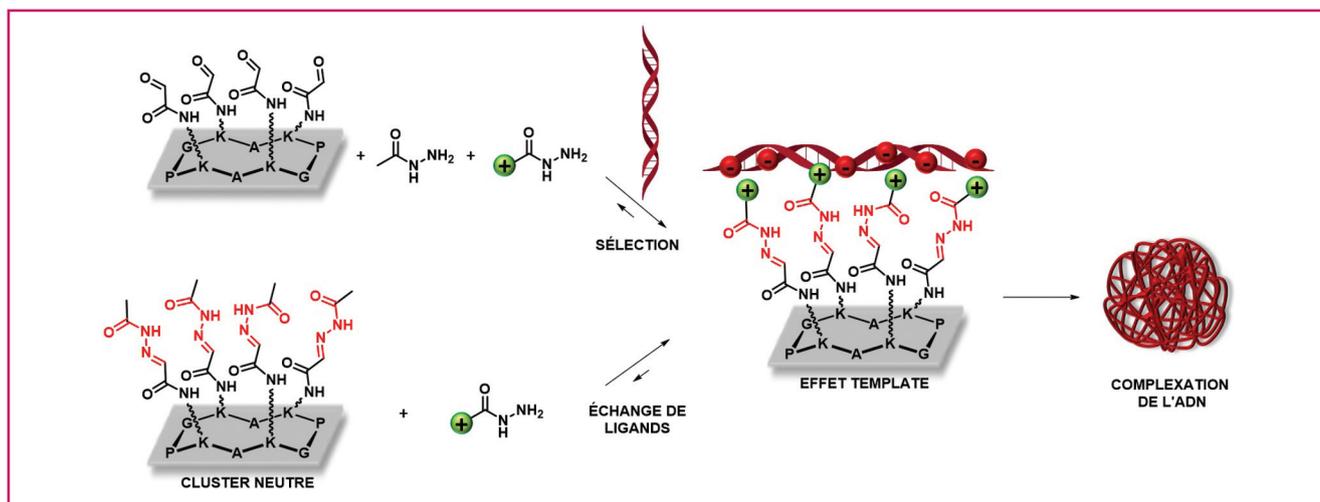


Figure 5 - Formation d'un complexe d'ADN par sélection (haut) ou échange de ligands (bas) entre l'hydrazide neutre et l'hydrazide cationique, pour générer des clusters cationiques avec la plateforme par effet template de l'ADN.

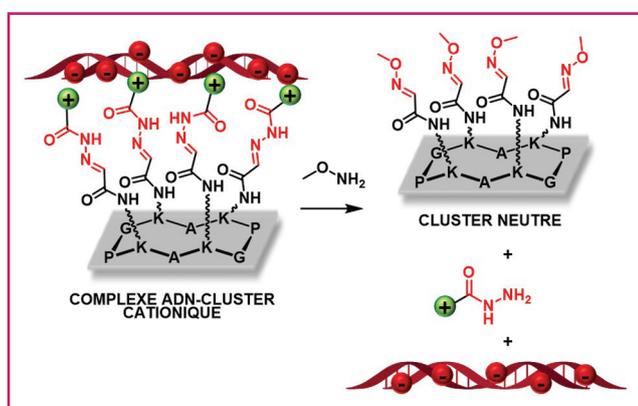


Figure 6 - Contrôle de la décomplexation de l'oligonucléotide par ajout de méthoxyamine.

Les résultats de complexation d'ADN ont par exemple montré la supériorité des clusters à plateforme cyclique par rapport à ceux à plateforme linéaire. Une différence significative a également été observée en fonction de la chiralité des acides aminés, les clusters présentant la *L*-arginine étant plus efficaces que ceux présentant la *D*-arginine.

Finalement, nous avons testé les clusters les plus efficaces pour leur capacité à complexer et à transfecter des siARN au sein de cellules vivantes. Les tests de transfection ont démontré le rôle majeur de la multivalence des ligands cationiques pour permettre la vectorisation de siARN. Alors qu'un cluster fonctionnalisé avec quatre arginines ne permet pas la pénétration cellulaire de l'oligonucléotide, un système portant douze résidus de ce même acide aminé délivre avec succès le siARN qui retient son activité biologique de silencage du gène de la luciférase.

Conclusion

L'utilisation de la chimie covalente dynamique permet de préparer, de manière rapide et efficace, des clusters biomoléculaires par auto-assemblage de fragments en milieu aqueux. Les clusters cationiques multivalents complexent efficacement divers types d'acides nucléiques (ADN, siARN). De plus, ces auto-assemblages étant dynamiques car formés de liaisons acylhydrazone réversibles, nous avons pu

démontrer leur constitution par la sélection des ligands cationiques qui permettent d'exprimer le meilleur système de reconnaissance. Cette stratégie d'auto-assemblage offre la possibilité de générer *in situ* des clusters dynamiques qui peuvent s'adapter à la cible biologique. D'un autre côté, nous avons montré qu'un échange forcé de ligands permet de déclencher la décomplexation de l'oligonucléotide. Il est ainsi possible de contrôler l'activité du système par un simple effecteur chimique. Finalement, nous avons exploité cette méthodologie d'auto-assemblage pour identifier, à partir d'un criblage de fragments, une première génération de systèmes permettant de vectoriser des siARN fonctionnels au sein de cellules vivantes. Ces vecteurs artificiels auto-assemblés ouvrent de nouvelles opportunités pour la complexation et la vectorisation d'acides nucléiques à des fins de thérapie génique ou encore de transport de molécules d'intérêt [15].

Les auteurs remercient la section Languedoc-Roussillon de la Société Chimique de France pour l'attribution du Prix de thèse 2016 ainsi que le LabEx CheMISyst (ANR-10-LABX-05-01) pour le financement de ce projet.

Références

- [1] Mammen M., Choi S.K., Whitesides G.M., Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, p. 2755.
- [2] Fiore M., Berthet N., Marra A., Gillon E., Dumy P., Dondoni A., Imberty A., Renaudet O., Tetravalent glycocyclopeptide with nanomolar affinity to wheat germ agglutinin, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, p. 7113.
- [3] McGinty R.K., Tan S., Nucleosome structure and function, *Chem. Rev.*, **2015**, 115, p. 2255.
- [4] Clerc F., Commerçon A., Vauzeilles B., Couplage chimique de biomolécules *in cellulo* et *in vivo*, *L'Act. Chim.*, **2015**, 393-394, p. 24.
- [5] Sigwald D., Holler M., Iehl J., Nierengarten J.F., Nothisen M., Morin E., Remy J.S., Gene delivery with polycationic fullerene hexakis-adducts, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, p. 4640.
- [6] Martinez A., Bienvenu C., Blanco J.L.J., Vierling P., Mellet C.O., Fernandez J.M.G., Di Giorgio C., Amphiphilic oligoethyleneimine- β -cyclodextrin "click" clusters for enhanced DNA delivery, *J. Org. Chem.*, **2013**, 78, p. 8143.
- [7] Bagnacani V., Franceschi V., Bassi M., Lomazzi M., Donofrio G., Sansone F., Casnati A., Ungaro R., Arginine clustering on calix[4]arene macrocycles for improved cell penetration and DNA delivery, *Nat. Commun.*, **2013**, 4, p. 1721.
- [8] Posocco P., Prici S., Jones S., Barnard A., Smith D.K., Less is more - multiscale modelling of self-assembling multivalency and its impact on DNA binding and gene delivery, *Chem. Sci.*, **2010**, 1, p. 393.
- [9] Ulrich S., Dumy P., Probing secondary interactions in biomolecular recognition by dynamic combinatorial chemistry, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, p. 5810.

- [10] Gasparini G., Bang E.-K., Montenegro J., Matile S., Cellular uptake: lessons from supramolecular organic chemistry, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, p. 10389.
- [11] Catana R., Barboiu M., Moleavin I., Ciima L., Rotaru A., Ursu E.-L., Pinteala M., Dynamic constitutional frameworks for DNA biomimetic recognition, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, p. 2021.
- [12] Bouillon C., Paolantoni D., Rote J.C., Bessin Y., Peterson L.W., Dumy P., Ulrich S., Degradable hybrid materials based on cationic acylhydrazone dynamic covalent polymers promote DNA complexation through multivalent interactions, *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, p. 14705.
- [13] Bartolami E., Bessin Y., Gervais V., Dumy P., Ulrich S., Dynamic expression of DNA complexation with self-assembled biomolecular clusters, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54, p. 10183.
- [14] Bartolami E., Bessin Y., Bettache N., Gary-Boho M., Garcia M., Dumy P., Ulrich S., Multivalent DNA recognition by self-assembled clusters: deciphering structural effects by fragments screening and evaluation as siRNA vectors, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, p. 9427.
- [15] Bartolami E., Bouillon C., Dumy P., Ulrich S., Bioactive clusters promoting cell penetration and nucleic acid complexation for drug and gene delivery applications: from designed to self-assembled and responsive systems, *Chem. Commun.*, **2016**, 52, p. 4257.



E. Bartolami



S. Ulrich



P. Dumy

Après sa thèse traitant de l'ingénierie et de l'auto-assemblage de systèmes biomoléculaires multivalents, soutenue en 2015 à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM)*, **Eline Bartolami (auteur correspondant)** est actuellement postdoctorante dans le laboratoire du Prof. Stefan Matile à l'Université de Genève**. Elle travaille sur l'étude de la pénétration cellulaire assistée par des poly(disulfure)s. **Elle a obtenu en 2016 le Prix de thèse de la section Languedoc-Roussillon de la Société Chimique de France.**

Sébastien Ulrich (auteur correspondant)

est chargé de recherche à l'IBMM où il poursuit ses activités de recherche dans le domaine de la chimie bioorganique supramoléculaire, et en particulier sur le développement d'auto-assemblages dynamiques bioactifs*. Il a été nommé en 2014 Membre distingué Junior par la Société Chimique de France.

Pascal Dumy

est directeur de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier (ENSCM). Ses activités de recherche à l'IBMM* sont centrées sur l'ingénierie, la synthèse et la validation de systèmes fonctionnels et d'interfaces dotées de propriétés, construites sur mesures, pour des applications thérapeutiques et/ou de diagnostics.

* Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247 CNRS/Université de Montpellier/ENSCM, École Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, 8 rue de l'École Normale, F-34296 Montpellier Cedex 5.

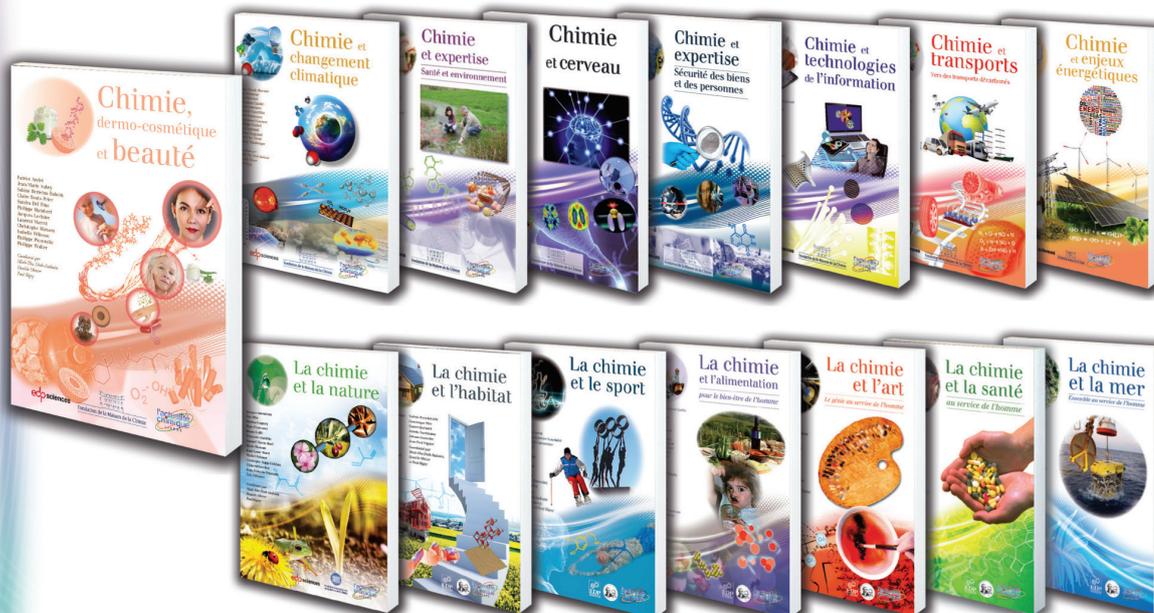
Courriel : Sebastien.Ulrich@enscm.fr

** Université de Genève, Département de Chimie organique, 30 quai Ernest Ansermet, CH-1211 Genève 4.

Courriel : Eline.Bartolami@unige.ch

CHIMIE ET...

une collection intelligente à vocation pédagogique
à mettre en toutes les mains !!



Commandez en ligne sur laboutique.edpsciences.fr

edp sciences