



HAL
open science

Internalisation cellulaire et activité biologique de PNA bloqueurs stériques de la traduction, conjugués au peptide (R/W)9

Céline Cordier

► **To cite this version:**

Céline Cordier. Internalisation cellulaire et activité biologique de PNA bloqueurs stériques de la traduction, conjugués au peptide (R/W)9. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P601 . tel-00964872

HAL Id: tel-00964872

<https://theses.hal.science/tel-00964872>

Submitted on 24 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES – PARIS V

Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Environnement

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée par

Céline CORDIER

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris Descartes

**Internalisation cellulaire et activité biologique de PNA
bloqueurs stériques de la traduction, conjugués au peptide
(R/W)₉**

Soutenue le 23 janvier 2014 devant le jury composé de :

Pr. Claude Malvy	Université Paris Sud, Paris	Rapporteur
Dr. Sandrine Sagan	Université Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur
Dr. Virginie Escriou	Université Paris Descartes, Paris	Examineur
Dr. Jean-Jacques Toulmé	INSERM, Bordeaux	Examineur
Pr. Michel Vidal	Université Paris Descartes, Paris	Examineur
Pr. Tula Saison-Behmoaras	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris	Directrice de thèse

Thèse réalisée au sein du laboratoire de Régulation et Dynamique des Génomes du Muséum National d'Histoire Naturelle, INSERM U565, CNRS UMR 7196



à mes parents

Remerciements

Je remercie vivement le Docteur Sandrine Sagan et le Professeur Claude Malvy d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci également au Professeur Michel Vidal et aux Docteurs Virginie Escriou et Jean-Jacques Toulmé d'avoir accepté d'être membres du jury et d'évaluer ce travail.

Je remercie l'école doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie et Environnement (MTCÉ) et l'université Paris Descartes pour avoir financé cette thèse.

Je remercie le Docteur Carine Giovannangeli et le Professeur Jean-François Riou pour m'avoir donné la chance de travailler dans leur unité. Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Professeur Tula Saison-Behmoaras, pour sa disponibilité et pour m'avoir toujours apporté son soutien et sa confiance.

Un grand merci à toutes les personnes avec qui nous avons eu l'occasion de collaborer sur ce sujet : les Docteurs Fabienne Burlina et Gérard Chassaing pour les CPP, les Docteurs Stéphanie Bonneau et Christine Vevert-Bizet pour les aspects PCI, et le Docteur Alain Joliot et Edmond Dupont du Collège de France pour les expériences de microscopie confocale.

Je remercie les membres de l'équipe avec qui j'ai travaillé, les Docteurs Carine Giovannangeli et Fanny Marlin pour notre travail commun sur l'internalisation cellulaire des PNA et pour nos nombreuses discussions à ce sujet, le Docteur Fatima Boutimah et le Docteur Sabine Lecosnier pour son travail sur la partie IGF1R et l'expérience qu'elle m'a transmise. Merci également au Docteur Jean-Christophe François pour ses compétences et son investissement dans le projet sur IGF1R.

Je tiens également à remercier les différents étudiants qui m'ont assistée sur ce projet : Arlette Le Grand de Mercey, Myriam Rahhab, Mathilde Bourdeloux, Florian Dupuy et Elisabeth Met. J'ai beaucoup apprécié travailler avec vous tous et je vous souhaite une bonne continuation dans vos études ou emplois.

Mes remerciements se tournent ensuite vers plusieurs personnes du laboratoire qui m'ont particulièrement aidée au cours de ma thèse et avec qui j'ai apprécié pouvoir interagir : François Loll pour son aide précieuse au microscope, Loïc Perrouault pour être toujours prêt à apporter son aide pour tous genres de gels et pour ses conseils pratiques, Patrizia Alberti pour les expériences de spectroscopie d'absorption et pour nos discussions intéressantes qui les accompagnaient, Charlotte Boix pour tous ses conseils sur la culture cellulaire ou autre, Anne De Cian pour son aide pour tout type de clonage ou PCR et pour ses conseils pour la rédaction de ma thèse, Loïc Ponger pour ses réponses à mes questions de bioinformatique, Sacha Boutorine pour m'avoir initiée à la

chromatographie HPLC et Julien Cochenec pour sa disponibilité pour nous les 'd'jeun's' et son aide pour résoudre tous mes problèmes informatiques.

Je remercie tous les membres de l'unité pour leur sympathie et pour la bonne ambiance qui règne au laboratoire. Une pensée pour tous les anciens doctorants que j'ai eu la chance de connaître : Julien, Kahina, Elodie, Tiphonie, Fatima, Alex, Pierre, Fanny, Sabine, Christine, Céline M, Asta, Najah, Layal... Merci à Fara, Corinne et Patricia du secrétariat pour leur patience et leur gentillesse. Des remerciements spéciaux pour Charlotte et François avec qui j'ai partagé mon bureau (le bureau des 'k', on se comprend...) avec grand plaisir. Merci pour votre humour (spéciale dédicace à François) et votre bonne humeur quotidienne. Je remercie bien sûr les doctorants encore présents au laboratoire : Jean, Armelle, Vivien, Karine, Marion, Hind, Lorena. Merci pour votre enthousiasme et votre bonne humeur et bon courage pour la fin de votre thèse. Une pensée particulière pour Jean, qui soutiendra sa thèse quelques semaines après moi. Merci également aux post-doctorants, notamment à Xénia, merci pour ta gentillesse, je te souhaite de trouver ta voie et ne doute pas que ta culture scientifique te permettra de t'épanouir dans un nouveau projet. J'adresse ensuite mes remerciements aux personnes qui m'ont le plus soutenue au quotidien au labo, dans les bons moments comme dans les moments difficiles. Merci Fanny pour nos midis au badminton ou au stretching, nos heures partagées dans le L2 et pour m'avoir transmis une partie de ton talent d'imitatrice. Merci Hind pour ta sincérité, pour notre humour commun (la crème brûlée) et tes bricks d'anniversaire. Merci Charlotte pour tes petites attentions qui m'ont souvent touchée. J'ai été heureuse de vous côtoyer, au labo ou ailleurs et je ne compte pas nos fous rires et les bons souvenirs que je garderai, et ceux à venir ;)

Enfin, je remercie très affectueusement mes amis et ma famille, chez qui je puise mon souffle et mes forces. Merci de m'avoir supportée dans des moments parfois difficiles. Merci à Aurélie, mon ex-voisine de quartier, pour nos séances sportives et nos discussions sur nos avenir professionnels. Merci à Sana et Bibi pour votre soutien, bon courage pour votre dernière année de thèse. Merci à Laurent, mon bisontin préféré, mais j'espère que tu ne comptes pas t'exiler encore après ta thèse ;) Merci à Mathilde et Audrey pour votre amitié, votre confiance et votre patience. L'UPMC restera toujours un lieu particulier pour nous, emprunt de tant de souvenirs. Merci à ma meilleure amie Lorena d'être présente à chaque instant et de me redonner un peu de confiance en moi quand cela me fait défaut. Nos petits déjeuners matinaux et tous ces moments passés ensemble au labo vont beaucoup me manquer. Je ne peux trouver de mots suffisants pour te remercier à la hauteur de ton soutien. Merci à ma sœur et à mon frère. Merci à mes grands parents. Merci à mes parents d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir donné les moyens de réussir, je leur dédie cette thèse.

Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGO	Argonaute
AHX	Acide 6-aminohexanoïque
ARNi	ARN interférence
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMV	Cytomégalovirus
CPP	Cell-penetrating Peptides
DMD	Duchenne Muscular Dystrophy
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOG	2-Déoxy-D-Glucose
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoéthanolamine
DOSPA	2,3-Dioleoyloxy-N-[2(Sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-diméthyl-1-Propanaminium Trifluoroacetate
DOTMA	N-[1-(2, 3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride
dsARN	Double Stranded ARN
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ESE	Exonic Splicing Enhancers
ESS	Exonic Splicing Silencers
GTP	Guanosine Triphosphate
GAG	Glycosaminoglycanes
HCV	Hepatitis C Virus
HDL	High Density Lipoprotein
HeLa	Henrietta Lacks
HRP	Horseradish Peroxydase
HS	Héparane Sulfate
HSPG	Héparane Sulfate Protéoglycanes
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-I
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IR	Insulin Receptor
ISE	Intronic Splicing Enhancers
ISS	Intronic Splicing Silencers

LDH	Lactates Déshydrogénases
LDL	Low-Density Lipoprotein
LNA	Locked Nucleic Acid
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometer
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
miARN	Micro ARN
2'-MOE	2'- <i>O</i> -Méthoxyethyl
NLS	Nuclear Localisation Signal
nt	Nucléotide
2'-OMe	2'- <i>O</i> -Méthyl
pb	Paire de Bases
PCI	Photochemical Internalization
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	PolyÉthylène Glycol
PEI	Polyéthylénimine
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PKR	Protéine Kinase R
PNA	Peptide Nucleic Acid
PO	Phosphodiester
PRR	Pattern Recognition Receptor
PS	Phosphorothioate
PSMA	Prostate-Specific Membrane Antigene
RFP	Red Fluorescent Protein
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNase	Ribonucléase
ROS	Reactive Oxygen Species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
shARN	Short Hairpin ARN
siARN	Small Interfering ARN
SLO	Streptolysine O
SVF	Sérum de Veau Fœtal
SV40	Simian Vacuolating virus 40
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamine
TLR	Toll-Like Receptors

T _m	Melting temperature
TPPS _{2a}	Tétraphénylporphine disulfonate
TRBP	TAR RNA Binding Protein
TR	Texas Red
UR	Untranslated Region
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des matières

Table des matières	11
Introduction	19
Chapitre I : La stratégie antisens	20
I. 1. L'ARN interférence	21
1. 1. ARN interférents	22
a) miARN	22
b) siARN et shARN.....	24
1. 2. Mécanismes de répression post-transcriptionnelle conduite par les miARN.....	24
1. 3. Défis	28
1. 4. Développement clinique.....	30
I. 2. Les oligonucléotides antisens	31
2. 1. Modifications chimiques et mécanismes associés	31
a) 1 ^{ère} génération.....	33
b) 2 ^{ème} génération	34
c) 3 ^{ème} génération.....	36
2. 2. Les applications.....	41
a) Inhibition de la traduction	41
b) Modulation de l'épissage	44
c) Blocage des miARN.....	51
I. 3. Conclusion : utilisation et défis de la stratégie antisens	52
Chapitre II : Internalisation cellulaire des acides nucléiques	53
II. 1. Nécessité de la vectorisation.....	53
1.1. Des premiers essais à la recherche de transporteurs pour les acides nucléiques... 53	
1.2. Les barrières biologiques extracellulaires	54
1.3. Internalisation cellulaire	55
a) Mécanismes d'internalisation cellulaire.....	55
b) Stratégies d'échappement endosomal	58
c) Le noyau : une barrière supplémentaire ?	61
II. 2. Stratégies non virales d'internalisation des acides nucléiques	61
2.1. Méthodes physiques	62
2.2. Méthodes photochimiques.....	64
2.3. Méthodes chimiques.....	66

a) Nanotransporteurs	66
i) Lipoplexes et polyplexes	66
ii) Nanoparticules	70
b) Aptamères	71
c) Petites molécules organiques et peptides	73
d) Cell Penetrating Peptides (CPP)	75
i) Classification	76
ii) Mécanismes d'internalisation	77
iii) Interactions avec la membrane plasmique	80
iv) Stratégie covalente / non covalente	83
v) Conclusions	87
Chapitre III : Ciblage du récepteur à l'Insulin-like Growth Factor 1	89
III. 1. Le récepteur à l'IGF1	90
3. 1. Structure et fonction	90
a) IGF1R et l'axe IGF	90
b) Voies de signalisation intracellulaires	91
c) Fonctions biologiques	93
d) IGF1R et IR	94
3. 2. Implication dans le cancer	95
3. 3. Stratégies de ciblage	96
a) Anticorps monoclonaux	96
b) Inhibiteurs de tyrosines kinases	97
c) Inhibition de l'expression de l'IGF1R par stratégie antisens	98
d) Protéines tronquées dominants négatifs de l'IGF1R	99
e) Autres approches	101
III. 2. Inhibition de l'élongation de la traduction de l'IGF1R pour générer une protéine tronquée dominant négatif	102
Chapitre IV : Projet de thèse	103
Résultats	105
Chapitre I : Inhibition de la traduction par des oligonucléotides bloqueurs stériques	107
I. 1. Comparaison de différentes modifications chimiques de bloqueurs stériques <i>in vitro</i> et <i>in cellulo</i>	107
1. 1. Système d'étude : la séquence Polypurine Tract (PPT) de l'intégrase du VIH .	108
1. 2. Activité biologique d'oligonucléotides dirigés contre la séquence PPT	109
a) Inhibition de l'élongation de la traduction <i>in vitro</i>	109

b) Inhibition de l'initiation de la traduction dans les cellules HeLa	111
1. 3. Etudes des complexes formés <i>in vitro</i> avec l'ARN complémentaire.....	114
1. 4. Conclusions	119
I. 2. Inhibition de l'élongation de la traduction <i>in cellulo</i>	119
I. 3. Optimisation du PNA anti-IGF1R	124
3.1. Le PNA 959 et ses variants de taille	124
3. 2. Activité <i>in vitro</i>	125
a) Caractérisation des complexes formés entre les PNA et l'ARN.....	125
b) Efficacité pour arrêter l'élongation de la traduction	130
3. 3. Activité <i>in cellulo</i>	132
3. 4. Conclusions	135
I. 4. Discussion	135
Chapitre II : Internalisation cellulaire des PNA	141
II. 1. Internalisation des PNA dirigés contre la séquence PPT dans les cellules HeLa 1002 par le CPP (R/W)9.....	142
1. 1. Conjugués PNA-CPP	142
1. 2. Etude de l'internalisation du PNA AS2 par les peptides (R/W)9 et (K/W)9.....	143
a) Internalisation libre	143
b) Internalisation assistée par la chloroquine et la PCI	144
Article : Cell Delivery of Antisense Peptide Nucleic Acids (PNAs) by the Small Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptide (R/W)9	144
c) Internalisation Photochimique (PCI) : études complémentaires.....	147
1. 3. Conjugués CPP-AS1	149
1. 4. Etudes complémentaires.....	155
a) Profils de marquage dans les cellules HeLa non perméabilisées vs perméabilisées	155
b) Comparaison de l'efficacité de différents agents lysosomotropiques.....	157
c) Observation des conjugués en microscopie confocale.....	159
II. 2. Internalisation du PNA C-13 dirigé contre l'ARNm de l'IGF1R dans les cellules DU145 par le CPP (R/W)9.....	162
II. 3. Discussion.....	164
Conclusion générale et perspectives	172
Matériel et Méthodes	176
Bibliographie.....	190

Annexes 211

Sommaire des Figures

<i>Figure 1 : Mécanismes impliqués dans la voie des ARN interférents (miARN, shARN et siARN) dans les cellules de mammifères.....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 2 : Mécanismes suggérés pour la répression post-transcriptionnelle conduite par les miARN dans les cellules animales</i>	<i>27</i>
<i>Figure 3 : PRR (Pattern Recognition Receptors) impliqués dans la reconnaissance des siARN et réponse immunitaire innée associée.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 4 : Mécanismes d'action des oligonucléotides antisens.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 5 : Structures chimiques des oligonucléotides antisens</i>	<i>32</i>
<i>Figure 6 : Structures chimiques comparées des PNA et de l'ADN</i>	<i>38</i>
<i>Figure 7 : Fixation des PNA sur une séquence d'ADN double-brin homopurique par un mécanisme d'invasion de brin.....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 8 : Mécanismes de correction d'épissage par les oligonucléotides antisens bloqueurs stériques</i>	<i>45</i>
<i>Figure 9 : Correction d'épissage de l'ARN pre-messager de la β-globine</i>	<i>46</i>
<i>Figure 10 : Rôles des séquences exoniques ESS/ESE (Exonic Splicing Silencer/ Exonic Splicing Enhancer) et des séquences introniques ISS/ISE (Intronic Splicing Silencer/Intronic Splicing Enhancer).....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 11 : Approche de saut d'exon dans le cadre de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)</i>	<i>49</i>
<i>Figure 12 : Voies d'endocytose.....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 13 : Mécanismes d'échappement endosomal</i>	<i>60</i>
<i>Figure 14 : Mécanisme proposé pour la libération de Tat-Cre dans le cytoplasme, assistée par un co-traitement avec un conjugué Tat-HA2.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 15 : Principe de la Photochemical Internalization (PCI)</i>	<i>64</i>
<i>Figure 16 : Structures chimiques des photosensibilisateurs tétraphénylporphine disulfonate (TPPS_{2a}) et phthalocyanine d'aluminium disulfonate (AlPcS_{2a})</i>	<i>65</i>
<i>Figure 17 : Composition et structure d'un liposome de type SNALP (Stabilized Nucleic Acid Lipid Particle).....</i>	<i>68</i>
<i>Figure 18 : Composition des nanoparticules CALAA-01.....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 19 : Structure de la chimère entre l'aptamère anti PSMA et un siARN dirigé contre le gène de survie cellulaire Plk1.....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 20 : Structures schématiques des chimères constituées de l'aptamère anti-gp120 et d'un siARN</i>	<i>72</i>
<i>Figure 21 : Structures chimiques de petites molécules organiques utilisées pour la vectorisation des acides nucléiques.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 22 : Principaux mécanismes de translocation directe des CPP dans les cellules</i>	<i>79</i>
<i>Figure 23 : Structure des protéoglycanes membranaires (HSPG)</i>	<i>81</i>
<i>Figure 24 : Réduction de la répulsion de charge par les lysines et les arginines</i>	<i>82</i>
<i>Figure 25 : Mécanismes proposés pour l'internalisation de R₉ dans les cellules CHO.....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 26 : Mécanismes possibles d'échanges des thiols entre un CPP et une protéine membranaire.....</i>	<i>85</i>

<i>Figure 27 : Structure de l'IGF1R.</i>	91
<i>Figure 28 : Signalisation cellulaire associée à l'IGF1R.</i>	93
<i>Figure 29 : Protéines tronquées dominants négatifs de l'IGF1R décrites dans la littérature.</i>	101
<i>Figure 30 : Structure chimique des PMO, LNA et PNA.</i>	108
<i>Figure 31 : Représentation schématique de l'ARNm de l'intégrase de HIV-1 et position de la séquence PPT.</i>	108
<i>Figure 32 : Inhibition de l'élongation de la traduction de l'intégrase in vitro par les PNA 13mer AS1 et AS2.</i>	109
<i>Figure 33 : Inhibition de la traduction de l'intégrase in vitro par les PNA 13-mer (AS1 et AS2), PNA-18 mer (PNA18) et LNA 18-mer (LNA18).</i>	111
<i>Figure 34 : Construction intégrée stablement dans les cellules HeLa 1002</i>	111
<i>Figure 35 : Fixation des PNA AS1 et AS2 sur la séquence PPT mutée contenue dans la construction des cellules HeLa 1002.</i>	112
<i>Figure 36 : Activité luciférase et expression de la GFP dans les cellules HeLa perméabilisées.</i>	113
<i>Figure 37 : Inhibition de la traduction par les PNA 13-mer (AS1, AS2 et scr2), PNA-18 mer (PNA18), LNA 18-mer (LNA18) et PMO 18-mer (PMO18).</i>	114
<i>Figure 38 : Retards de migration sur gel de polyacrylamide des complexes formés entre l'ARN 19-mer et les PNA AS1 et AS2</i>	115
<i>Figure 39 : Retard de migration sur gel d'acrylamide 15% des complexes formés entre l'ARN sauvage 19 mer radiomarké (2 nM) et le PNA18, le LNA 18 ou le PMO 18.</i>	116
<i>Figure 40 : Représentation schématique des ARN PPT WT (ARN WT) et muté (ARN mut) et des complexes formés avec le PNA AS1.</i>	117
<i>Figure 41 : Retards de migration sur gel de polyacrylamide 15%, des complexes formés entre l'ARN 19 mer radiomarké (2 nM), dénaturé par préchauffage 10 min à 90°C, et des quantités croissantes de PNA AS1k (gauche) et AS2k (droite), en tampon Tris 50 mM.</i>	118
<i>Figure 42 : Séquences PPT sauvage et synthétique.</i>	121
<i>Figure 43 : Expression de l'intégrase synthétique dans les cellules humaines DU145 transfectées avec le plasmide pVax-INSyn.</i>	122
<i>Figure 44 : Traductions in vitro de l'intégrase synthétique dans du lysat de réticulocyte de lapin, en présence ou en absence des PNA AS1 et AS2.</i>	123
<i>Figure 45 : Retards de migration sur gel de polyacrylamide 15% (EMSA) des PNA C-16 à C-13 (A) et N-16 à N-13 (B).</i>	127
<i>Figure 46 : Séparation sur gel natif de polyacrylamide 15% (gel retard), des complexes formés entre l'ARN 959 17-mer radiomarké et le PNA indiqué, à 100 ou 300 nM.</i>	127
<i>Figure 47 : Analyses spectroscopiques du PNA 959 et des PNA 13- et 14-mer.</i>	129
<i>Figure 48 : Représentation schématique de la fixation des anticorps (Ac) H60 et C20 sur l'IGF1R.</i> 130	
<i>Figure 49 : Inhibition de la traduction in vitro et formation de la protéine tronquée, en présence des différents PNA variants de taille.</i>	132
<i>Figure 50 : Inhibition de l'expression de la sous-unité β de l'IGF1R par les PNA N-13 et C-13 dans les cellules humaines DU145.</i>	134
<i>Figure 51 : Inhibition de l'expression de la sous-unité β de l'IGF1R par les PNA C-11 et C-12 dans les cellules humaines DU145.</i>	134
<i>Figure 52 : PCI du conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA dans les cellules HeLa 1002.</i>	147

<i>Figure 53 : PCI observée pour le conjugué (R/W)9-scr2-TAMRA dans les cellules HeLa 1002.</i>	148
<i>Figure 54 : Activité luciférase obtenue pour les conjugués (R/W)9-PNA-TAMRA après PCI.</i>	149
<i>Figure 55 : Inhibition de l'activité luciférase par les PNA et conjugués PNA-CPP dans les cellules HeLa 1002 perméabilisées avec la SLO.</i>	150
<i>Figure 56 : Internalisation des PNA AS1 et AS2 conjugués au CPP (R/W)9 dans les cellules HeLa 1002.</i>	151
<i>Figure 57 : Internalisation des PNA AS1 et AS2 conjugués au CPP (R/W)9 dans 4 lignées cellulaires humaines.</i>	151
<i>Figure 58 : Dépendance énergétique de l'internalisation du conjugué (R/W)9-AS1-TR dans les cellules HeLa 1002.</i>	153
<i>Figure 59 : Comparaison de l'internalisation du conjugué (R/W)9-AS1-TR dans les cellules CHOK1 et dans les cellules CHO745.</i>	154
<i>Figure 60 : Effet du co-traitement des cellules HeLa 1002 avec les différents conjugués CPP-PNA-TR et la chloroquine (CQ).</i>	155
<i>Figure 61 : Internalisation cellulaire des conjugués (R/W)9-AS2-TR et (R/W)9-AS2-TR dans les cellules HeLa 1002.</i>	156
<i>Figure 62 : Perméabilisation par la SLO des cellules HeLa 1002 en présence des conjugués (R/W)9-AS2-TR et (K/W)9-AS2-TR.</i>	157
<i>Figure 63 : Internalisation cellulaire du conjugué (R/W)9-AS1-TR dans les cellules HeLa 1002, en présence de différents agents lysosomotropiques.</i>	158
<i>Figure 64 : Activités luciférase après internalisation libre du conjugué (R/W)9-AS2 en présence de CaCl₂.</i>	159
<i>Figure 65 : Observation en microscopie confocale, de cellules HeLa 1002 co-traitées pendant 4h avec le conjugué (R/W)9-AS1-TR et la chloroquine (CQ).</i>	160
<i>Figure 66 : Effets de la concentration du conjugué (R/W)9-AS1-TR sur l'internalisation dans les cellules HeLa 1002.</i>	161
<i>Figure 67 : Expression d'IGF1R-β dans les cellules DU145 électroporées en présence des PNA indiqués ou du conjugué (R/W)9-C13.</i>	162
<i>Figure 68 : Internalisation du conjugué (R/W)9-AS2-TR dans les cellules DU145 en absence (NT) ou en présence de 150 μM de chloroquine (CQ).</i>	163
<i>Figure 69 : Expression d'IGF1R-β dans les cellules DU145 traitées avec le conjugué (R/W)9-C13.</i>	164
<i>Figure 70 : Système rapporteur d'activité de correction d'épissage par les oligonucléotides antisens dans le noyau.</i>	169
<i>Figure 71 : Structure chimique d'un GPNA (T_g)₁₀.</i>	172
<i>Figure 72 : Structure chimique des conjugués PNA-acide cholique</i>	173
<i>Figure 73 : Structure chimique de la liaison entre le PNA et le CPP.</i>	177

Sommaire des Tableaux

<i>Tableau 1 : Description des principaux CPP décrits dans la littérature.....</i>	<i>76</i>
<i>Tableau 2 : Séquences des oligonucléotides 13-mer et 18-mer dirigés contre la séquence PPT.</i>	<i>110</i>
<i>Tableau 3 : Récapitulatif des résultats représentés sur les Figures 38 et 39.....</i>	<i>117</i>
<i>Tableau 4 : Séquence des PNA raccourcis en C-terminal (PNA N-16 à N-13) ou en N-terminal (PNA C-16 à C-11) par rapport au PNA 959.</i>	<i>125</i>
<i>Tableau 5 : Valeurs des IC₅₀ (nM) correspondants à la fixation des différents PNA variants de taille du 959 sur l'ARN 959 17-mer.</i>	<i>128</i>
<i>Tableau 6 : Conditions de PCI réalisées dans nos études avec les conjugués (R/W)9-AS2 et (R/W)9-AS2-TAMRA.</i>	<i>149</i>
<i>Tableau 7 : Séquences des PNA dirigés contre la cible PPT.....</i>	<i>176</i>
<i>Tableau 8 : Séquences des PNA dirigés contre l'IGF1R.</i>	<i>176</i>
<i>Tableau 9 : Composition en bases des PNA contrôles (scramble) utilisés dans les études avec les PNA ciblant l'IGF1R.</i>	<i>177</i>
<i>Tableau 10 : Séquences et caractéristiques peptidiques des CPP (R/W)9 et (K/W)9.....</i>	<i>177</i>
<i>Tableau 11 : Caractéristiques et conditions de culture des lignées cellulaires utilisées dans ce travail.</i>	<i>178</i>
<i>Tableau 12 : Séquence des ARN utilisés pour les expériences de gels retard.</i>	<i>182</i>

Introduction

Chapitre I	La stratégie antisense
Chapitre II	Internalisation cellulaire des acides nucléiques
Chapitre III	Ciblage du récepteur à l'IGF1
Chapitre IV	Projet de thèse

Chapitre I : La stratégie antisens

La plupart des médicaments actuellement sur le marché sont des petites molécules qui ciblent des protéines, principalement des enzymes ou des récepteurs cellulaires (Landry & Gies 2008). La stratégie antisens consiste en l'utilisation d'oligonucléotides antisens ou d'ARN interférents qui ciblent les ARN (ARN messagers, ARN pré-messagers ou miARN) et s'y fixent par complémentarité de bases, de manière séquence spécifique, permettant ainsi de moduler l'expression d'un gène. Cette stratégie est née de la découverte, en 1978, par Zamecnik et Stephenson du potentiel d'un oligonucléotide long de 13 bases et complémentaire à une séquence de l'ARN du virus du sarcome de Rous à inhiber la traduction des protéines virales en s'hybridant à l'ARN viral. Ceci a pour conséquence l'inhibition de la réplication virale dans des fibroblastes embryonnaires de poulet (Zamecnik & Stephenson 1978; Stephenson & Zamecnik 1978).

Un oligonucléotide antisens comporte en général de 13 à 25 bases, entièrement complémentaires à l'ARN cible, et s'hybride à ce dernier par liaisons Watson-Crick. Les mécanismes d'actions inhérents à cette interaction impliquent un clivage catalytique ou blocage stérique et sont dépendants de la structure chimique de l'oligonucléotide. Cette approche prometteuse, permettant en théorie de cibler n'importe quel gène, pourrait donc constituer un outil précieux en recherche pour des études fonctionnelles. De plus, elle serait en mesure d'apporter une solution thérapeutique à tous types de maladies impliquant un défaut de régulation de l'expression génique (cancers, maladies auto-immunes, maladies inflammatoires, infections virales ou bactériennes...). L'enthousiasme ainsi soulevé fut malheureusement confronté à certains obstacles, notamment à des problèmes de toxicité et de stabilité des oligonucléotides ADN dans les milieux biologiques. Néanmoins, la conception d'une vingtaine de modifications chimiques introduites dans la structure de l'ADN ou de l'ARN a permis d'améliorer nettement leurs propriétés. De plus, la compréhension des régulations post-transcriptionnelles de l'expression des gènes fut bouleversée par la découverte de la voie de l'ARN interférence (ARNi) à la fin des années 1990, et de l'utilisation des small interfering RNA (siRNA) pour moduler l'expression génique (Fire et al. 1998; Elbashir et al. 2001).

Dans cette partie seront présentées les différentes chimies d'oligonucléotides antisens, ainsi que les siRNA, et les mécanismes qui leur sont associés. Il existe trois principales applications des oligonucléotides antisens : inhibition de l'initiation ou de l'élongation de la

traduction (ciblage de l'ARN messager), modulation de l'épissage des ARN pré-messager et inhibition de la fonction de certains ARN non codants, notamment les micro-ARN (miARN). Celles-ci seront explicitées et illustrées par les principaux exemples connus dans la littérature.

I. 1. L'ARN interférence

Le concept d'ARN interférence fut introduit en 1998 par Fire et Mello, qui montrèrent que l'introduction de faibles quantités de longs ARN exogènes double-brins (>299 pb) chez le nématode *C.elegans* provoquait l'inhibition des gènes cibles correspondants (Fire et al. 1998). Dans les années qui suivirent, des études chez la drosophile montrèrent que les ARN double-brins régulent l'expression des gènes en médiant spécifiquement un clivage endonucléolytique des ARN messagers correspondants (Zamore et al. 2000; Hammond et al. 2000). L'identification de l'enzyme Argonaute 2 (AGO2) en tant que nucléase impliquée dans ce clivage fut réalisée peu de temps après (Hammond et al. 2001).

Dans les cellules de mammifères, il a été montré que les ARN double-brins de plus de 30 pb déclenchent une réponse immunitaire innée antivirale en activant la protéine kinase R (PKR), qui induit alors une inhibition non spécifique de la traduction, ainsi que la destruction des ARNm (Williams 1997). La même année, deux équipes ont montré (Elbashir et al. 2001; Caplen et al. 2001) pour la première fois que des duplexes synthétiques d'ARN double-brins de 21 nucléotides, appelés small interfering ARN (siARN), induisent une inhibition spécifique de la traduction de gènes cibles endogènes ou exogènes, après transfection dans des cellules de mammifères, évitant la réponse non spécifique induite par la PKR. Dans ces deux études, l'interférence provoquée par les siARN était plus importante que l'inhibition déclenchée par les ARN simple-brins de même séquence. Elbashir définit donc l'ARN interférence comme étant un processus de régulation de l'expression génique post-transcriptionnelle, séquence spécifique et initié par des ARN double-brins complémentaires de la séquence du gène cible. Ce processus est en outre conservé au sein du vivant, puisqu'il a été retrouvé chez les plantes, les champignons et les animaux.

1. 1. ARN interférents

a) miARN

La voie de l'ARN interférant est une voie cellulaire endogène (Figure 1) qui est utilisée pour la régulation de l'expression génique initiée par de petits ARN non codants endogènes, appelés microARN (miARN), qui ont un rôle important dans différents processus biologiques, tels que le développement, la prolifération cellulaire, l'hématopoïèse et l'apoptose (Rana 2007).

Chez les mammifères, les précurseurs primaires de ces ARN sont généralement transcrits par l'ARN polymérase II, à partir de régions intergéniques ou d'ADN intronique, et sont appelés *primary miARN* (pri-miARN). Ces molécules sont maturées dans le noyau par la RNase de type III Drosha qui les transforme en précurseurs de micro-ARN (pre-miARN), comportant une structure en boucle hairpin, une extrémité 5' phosphate et deux nucléotides sortants en 3'. Ces précurseurs sont ensuite exportés activement dans le cytoplasme *via* Ran-GTP et le récepteur nucléaire exportin-5, où ils sont substrats de l'endoribonucléase Dicer. Dicer, souvent associée à la protéine de liaison à l'ARN double-brin, TRBP (TAR RNA Binding Protein), clive la boucle, aboutissant au miARN mature, constitué de 21 nucléotides dont deux sont 3' sortants. La particularité des miARN est qu'ils comportent une complémentarité imparfaite pour leur cible ARN. Ces miARN sont ensuite reconnus et pris en charge par un complexe multi-protéique appelé RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Un des deux brins de l'ARN, appelé 'brin guide', est sélectionné dans le complexe RISC, tandis que l'autre brin, appelé 'brin passager' est clivé et éliminé du complexe RISC. Le brin guide correspond au brin antisens, qui est partiellement complémentaire à la séquence de l'ARNm cible. Le brin guide, complexé au RISC, reconnaît alors l'ARNm cible imparfaitement complémentaire, se fixe dans la région 3' UTR (Untranslated Region) de celui-ci et inhibe sa traduction.

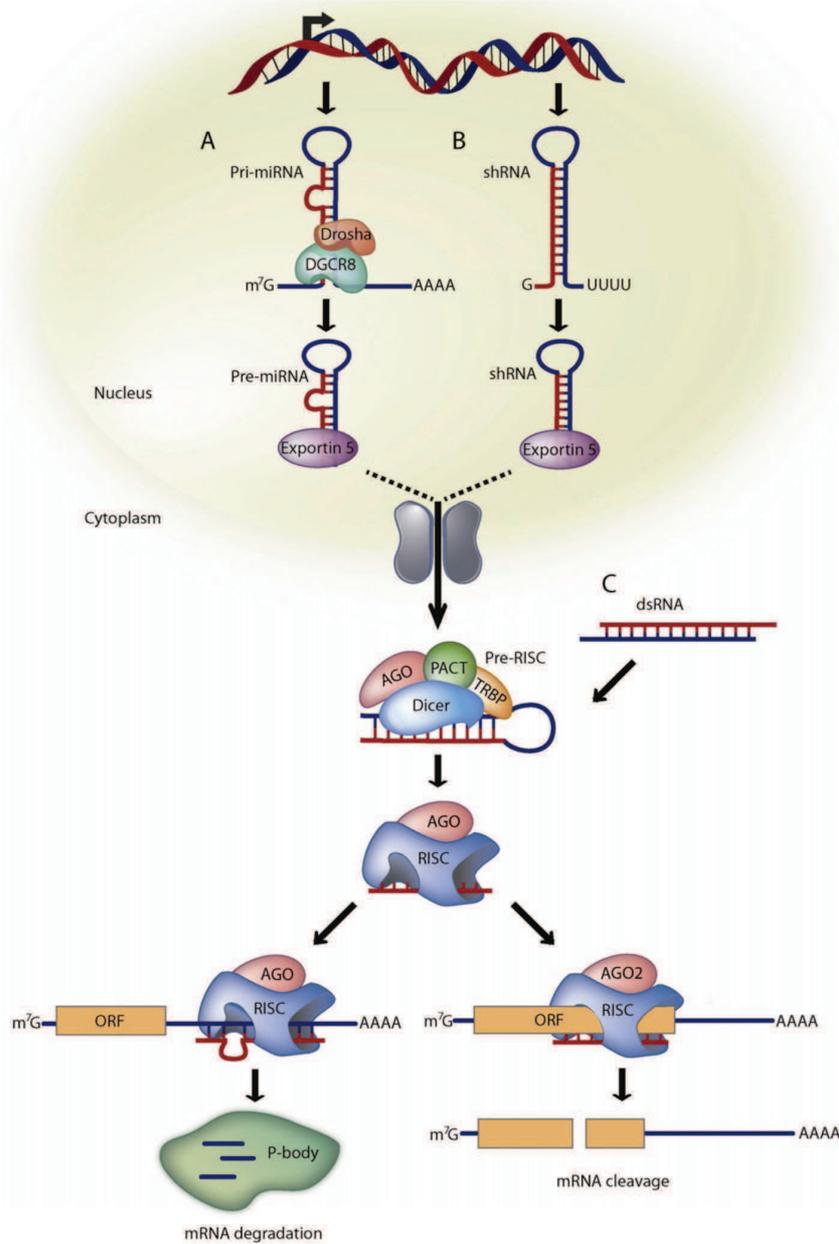


Figure 1: Mécanismes impliqués dans la voie des ARN interférents (miARN, shARN et siARN) dans les cellules de mammifères (d'après Burnett et Rossi 2012).

A. Les miARN sont transcrits sous forme de primary miARN (pri-miARN) qui sont ensuite clivés par Droscha et DGCR8 pour former les précurseurs de miARN de 70 nucléotides (pre-miARN). Ces précurseurs sont exportés dans le cytoplasme par une protéine de liaison à l'ARN double-brin : l'exportine-5, où ils sont maturés par le complexe Dicer/TRBP en miARN d'environ 22 nucléotides. Ces miARN matures sont alors pris en charge par le complexe RISC et par la protéine AGO, au sein duquel le brin passager est éliminé et le brin guide est sélectionné, permettant sa fixation sur l'ARNm cible avec une complémentarité imparfaite. L'inhibition de la traduction résulte alors de différents mécanismes possibles, tels qu'un stockage dans les P-bodies ou un clivage de l'ARNm. B. Les shARN sont transcrits par l'ARN polymérase III à partir de l'ADN et maturés par Dicer, avant d'être pris en charge par le complexe RISC de la même manière que les miARN. A la différence des miARN, le brin guide présente une complémentarité parfaite pour l'ARNm cible et le transcrit est clivé par l'enzyme AGO2. C. Les siARN, introduits de manière exogène dans la cellule, utilisent ce même mécanisme d'inhibition de la traduction de leur cible.

b) siARN et shARN

La voie de l'ARNi peut aussi être utilisée par les siARN synthétiques introduits dans la cellule. Ces petits ARN interférents double-brins (dont la taille est comprise entre 19 et 21 pb), sont pris en charge par le complexe RISC, au sein duquel le brin sens (passager) est éliminé, tandis que le brin antisens (guide) se lie à sa cible parfaitement complémentaire sur l'ARNm. Pour la sélection des brins, des données thermodynamiques indiquent que la protéine AGO2 détermine le brin guide comme étant celui comportant l'extrémité 5' la moins stable (principalement dû à un fort contenu en A/T) (Schwarz et al. 2003). Du fait de la complémentarité parfaite entre le brin guide et la séquence cible sur le messenger, l'endonucléase AGO2 au sein du RISC clive l'ARNm entre les nucléotides 10 et 11 (comptés à partir de l'extrémité 5' du brin antisens). Le complexe RISC associé au brin antisens est recyclé et peut à nouveau déclencher plusieurs événements de clivage catalytique.

Alternativement, les siARN peuvent être produits à partir de longs ARN double-brins exogènes appelés dsARN (double stranded ARN) ou de shARN (short hairpin ARN), qui sont des courts duplexes intramoléculaires d'ARN. Ces ARN seront clivés par l'enzyme Dicer, qui produira des duplexes siARN, de 20 à 25 nucléotides de longueur, comportant une extrémité 5'-monophosphate et une extrémité 3' avec deux nucléotides sortants. Ces paramètres (longueur et nature des extrémités) sont cruciaux pour la prise en charge par le complexe RISC. L'avantage d'exprimer les siARN à partir de dsARN ou de shARN réside dans la possibilité d'exprimer ces ARN stablement, à partir d'un vecteur plasmidique ou viral. En effet, à la différence des siARN, dont l'effet après transfection est transitoire (inhibition de la cible jusqu'à cinq à sept jours), les shARN stablement intégrés dans la cellule peuvent induire une inhibition à long terme.

1. 2. Mécanismes de répression post-transcriptionnelle conduite par les miARN

Des centaines de miARN sont aujourd'hui connus, chacun étant présumé réguler l'expression de centaines de cibles (Behm-Ansmant et al. 2006). Bien que les mécanismes précis de l'inhibition post-transcriptionnelle gouvernée par les miARN soient encore controversés, il semblerait qu'il s'agisse d'un blocage stérique dans la majorité des cas, sans destruction de l'ARNm (Deleavey & Damha 2012; Filipowicz et al. 2008). La Figure 2

récapitule les différents mécanismes suggérés pour la répression post-transcriptionnelle de l'expression des gènes dans les cellules animales.

Dans le cas d'une répression stérique de la traduction, de nombreux exemples sont en faveur d'un blocage de l'étape d'initiation de la traduction. Certaines études dans des cellules HeLa utilisant des ARN messagers rapporteurs exprimant la luciférase et comportant plusieurs sites de fixation pour un miARN naturel (*let-7* ; Pillai et al. 2005) ou synthétique (*CXCR4* ; Humphreys et al. 2005) dans leur 3'UTR, ont montré l'importance de la coiffe 7-méthylguanosine pour la répression induite par les miARN. En effet, l'introduction d'une séquence virale IRES (Internal Ribosomal Entry Site) en 5'UTR de l'ARNm, permettant l'association des ribosomes avec l'ARNm indépendamment de la coiffe, abolit l'activité répressive des miARN, mettant en évidence la nécessité de la 7-méthylguanosine pour cette répression traductionnelle. Plus précisément, ces études suggèrent une inhibition due à une interférence avec le recrutement du facteur d'initiation de la traduction eIF4E sur la 7-méthylguanosine, ou avec l'interaction entre les facteurs eIF4E et eIF4G. En effet, ces facteurs ont un rôle important dans la reconnaissance de l'ARNm par la sous-unité ribosomale 40S, ainsi que dans la circularisation de l'ARNm, qui stimule l'initiation de la traduction. De plus, certaines études (Bhattacharyya et al. 2006; Pillai et al. 2005) ont relevé que l'ARNm réprimé, ainsi que le miARN et la protéine AGO2, colocalisent dans les processing bodies (P-bodies), qui sont des structures cytoplasmiques impliquées dans le catabolisme des ARNm (déadénylation, decapping et dégradation), mais qui pourraient également avoir un rôle dans le stockage de ces ARN. Cette relocalisation dans les P-bodies serait plutôt une conséquence qu'une cause de la répression (Pillai et al. 2005; Eulalio et al. 2007), et apporte potentiellement un caractère réversible à l'inhibition provoquée par les miARN. Un mécanisme alternatif de l'action des miARN identifie le facteur d'initiation eIF6 comme cible potentielle de la machinerie miARN (Chendrimada et al. 2007). Ce facteur est essentiel pour la biogenèse de la sous-unité ribosomale 60S, et jouerait aussi un rôle dans la régulation de l'association de cette-unité à la sous-unité 40S lors de l'initiation de la traduction. En interagissant avec ce facteur, les protéines AGO pourraient réprimer la traduction en empêchant la sous-unité 60S de s'associer à la sous-unité 40S, interférant ainsi avec l'initiation de la traduction.

La répression engendrée par les miARN pourrait également se réaliser à des étapes de la traduction postérieures à l'initiation (Petersen et al. 2006; Olsen & Ambros 1999). Il a été

montré par des expériences de fractionnement des polysomes (ensemble des ribosomes sur un ARNm) par ultracentrifugation en gradient de sucrose, que l'ARNm réprimé par le miARN CXCR4 est associé à des polysomes actifs (Petersen et al. 2006). De plus, dans cet exemple, la traduction initiée par une séquence IRES est également réprimée par le miARN, et il semblerait que le miARN induise une terminaison prématurée de la traduction. Dans l'ensemble, les résultats seraient en faveur d'un modèle dit de 'ribosome drop off', dans lequel les ribosomes seraient dissociés prématurément de l'ARNm réprimé. Les mécanismes fins de la répression traductionnelle engendrée par les miARN sont donc encore mal compris, et pourraient être variables selon le système considéré (organisme, type cellulaire, niveaux d'expressions, cible ARNm, miARN...).

Cependant, les modèles de régulation de l'initiation et de l'élongation de la traduction ne sont pas forcément mutuellement exclusifs. Par exemple, il est envisageable que l'étape d'initiation soit toujours inhibée, mais que les ribosomes puissent s'accumuler quand l'étape d'élongation est également inhibée, masquant ainsi la détection de l'effet sur l'initiation (Filipowicz et al. 2008).

Une hypothèse supplémentaire parfois rapportée est un effet répressif résultant d'une dégradation de la protéine successivement à la traduction. Cependant, cette possibilité a été plusieurs fois envisagée et aucune protéolyse ou protéase associée n'a pu être mise en évidence. De plus, des inhibiteurs du protéasome sont sans effet sur la répression (Pillai et al. 2005).

Un dernier mécanisme envisagé concerne une dégradation de l'ARNm. En effet, selon le modèle général, le degré de complémentarité entre le miARN et sa cible gouverne le mode de répression : le miARN induira un clivage si l'ARNm contient une complémentarité suffisante (mécanisme semblable à celui des siARN), tandis qu'il réprimera la traduction sans dégradation de l'ARNm si celui-ci ne contient plus de mésappariements (Bartel 2004). Cependant, certaines études démontrent une déstabilisation de l'ARNm cible, dans des cas de complémentarité imparfaite. Une étude *in vivo* chez le nématode *C.elegans*, montre que le miARN endogène let-7 induit une inhibition d'un facteur trois de l'ARNm cible lin-41. Ce même miARN induit également l'inhibition des ARNm lin-14 et lin-28 qui comportent également des sites de fixation à ce miARN dans leur 3'UTR (Bagga et al. 2005). De plus, certaines données (Sen & Blau 2005; Liu et al. 2005) rapportant une colocalisation des miARN et de l'ARNm réprimé avec les protéines Argonautes (AGO1-AGO4), les enzymes d'excision de la coiffe DCP1 et DCP2 et l'exonucléase 5'→3' Xrn1 au sein des P-bodies, confortent l'hypothèse que certains miARN pourraient induire la dégradation de leur cible

dans ces centres spécialisés. En effet, si le mécanisme de clivage d'un miARN parfaitement complémentaire à sa cible est semblable à celui utilisé par les siARN (clivage par Ago2 de la liaison phosphodiester entre les nucléotides en position 10 et 11), la dégradation induite par les miARN serait consécutive à une déadénylation et une excision de la coiffe. Notamment, une étude chez la drosophile montre que la protéine GW182, requise pour l'intégrité des P-bodies, interagit avec les protéines AGO et initie la dégradation du transcrit *via* une déadénylation par le complexe CCR4-NOT et une excision de la coiffe *via* le complexe DCP1-DCP2 (Behm-Ansmant et al. 2006). On ignore encore si cette dégradation de l'ARNm se déroule de manière concomitante à la répression traductionnelle stérique, ou si elle la précède ou la succède. Les modèles supposant une inhibition de la circularisation de l'ARNm lors de la traduction pourraient favoriser une dégradation simultanée, la circularisation rendant la queue poly A moins vulnérable aux nucléases.

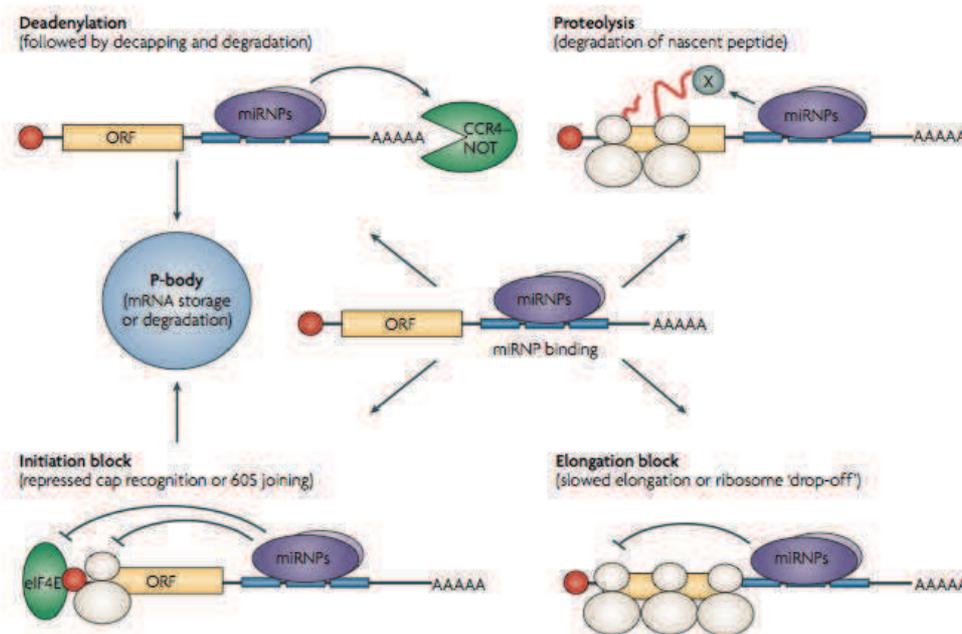


Figure 2 : Mécanismes suggérés pour la répression post-transcriptionnelle conduite par les miARN dans les cellules animales (d'après Filipowicz et al. 2008).

Le brin guide des miARN, associé au complexe RISC (miRNP, pour micro-ribonucléoprotéines), peut réprimer la traduction de sa cible par différents mécanismes, tels qu'une déadénylation par le complexe CCR4-NOT, ou un clivage protéolytique de la chaîne peptidique en cours de synthèse par une protéase (X). Un blocage stérique a également été suggéré, au niveau de l'initiation de la traduction (interférence avec la reconnaissance de la coiffe par le facteur d'initiation eIF4E, ou avec l'association des sous-unités ribosomales) ou de l'élongation (ralentissement de la vitesse d'élongation ou dissociation prématurée des ribosomes). Une relocalisation dans les P-bodies successive à la répression de l'initiation de la traduction ou à la déadénylation est suggérée, impliquant une dégradation ou un stockage de l'ARNm. Cercle rouge : coiffe 7-méthylguanosine.

1. 3. Défis

Le potentiel thérapeutique de ces ARNi, mis en évidence par toutes les études *in vitro* et *in vivo*, serait donc immense. Cependant, de nombreux points restent à améliorer pour parvenir au développement thérapeutique de ces technologies.

Tout d'abord, les acides nucléiques, et plus particulièrement l'ARN, sont rapidement dégradés dans les cellules. Les siARN ont donc une durée de vie limitée du fait de leur sensibilité aux nucléases. En effet, la demi-vie des siARN nus dans le sérum varie de quelques minutes à une heure (Behlke 2006). Le clivage, notamment par les enzymes de la famille des RNAses A, se produit plus fréquemment dans les régions riches en pyrimidines (Turner et al. 2007). Pour augmenter la résistance aux nucléases, l'introduction de nucléotides 2'-*O*-méthyl et de liaisons internucléotides phosphorothioates (voir Figure 5) à l'extrémité 3' du brin antisens est possible. Cependant, les modifications chimiques envisageables pour le brin antisens sont limitées, afin de conserver la fonctionnalité du siARN. Concernant le brin sens, un plus grand nombre de nucléotides modifiés est toléré (possibilité de substituer plus de nucléotides par des 2'-*O*-méthyl). Les modifications de chimie 2'-fluoro, seules ou en combinaison avec des purines 2'-*O*-méthyl, stabilisent également les siARN. Des nucléotides LNA peuvent également être incorporés dans les siARN, mais leur position est plus critique que pour les 2'-*O*-méthyl et 2'-fluoro.

De plus, des études de transcriptome (Jackson et al. 2003) ont révélé un effet 'off-target' des siARN, c'est-à-dire l'inhibition de l'expression de gènes autres que le gène cible. Il a été montré que la plupart de ces effets non spécifiques résultent d'une homologie avec une région précise du siARN appelée région 'seed'. Cette région, présente dans les siARN et les miARN, est composée des nucléotides 2 à 8 en partant de l'extrémité 5' du brin antisens et est une région dans laquelle la complémentarité de séquence pour la cible est parfaite, assurant la spécificité de ciblage. Chez les miARN, le reste de la séquence n'est que partiellement complémentaire. Il suffirait donc que cette séquence 'seed' corresponde à d'autres gènes pour que le siARN puisse exercer un effet semblable à celui d'un miARN, sur une cible non spécifique. Des approches bioinformatiques prédictives sont donc à considérer lors du *design* des siARN pour évaluer les possibles effets 'off-target'.

Enfin, les ARN double-brins étant reconnus par la cellule comme la signature d'une infection virale, les siARN peuvent déclencher une réponse immune innée conduisant à des

effets secondaires indésirables. En effet, la reconnaissance des siARN *via* des récepteurs appelés ‘Pattern Recognition Receptors’ (PRR) génère une réponse inflammatoire et antivirale (Whitehead et al. 2011). Parmi ces récepteurs, certains Toll-Like Receptors (TLR) sont impliqués dans la détection des siARN : TLR3 (localisé dans les membranes plasmique et endosomale, reconnaît l’ARN double-brin), TLR7 (localisé dans la membrane des endosomes, reconnaît l’ARN simple-brin) et TLR8 (localisé dans la membrane des endosomes, reconnaît l’ARN simple-brin).

Parmi les PRR, deux protéines cytoplasmiques jouent également un rôle dans cette reconnaissance des siARN : la protéine kinase PKR et la protéine RIG-I (Retinoic Acid-Inducible Gene-1). La PKR réagit de manière non spécifique avec des ARN double-brins de 11 pb de longueur, et induit une réponse interféron et une inhibition générale de la traduction. La réponse PKR provoquée par les siARN reste cependant modérée, par comparaison à celle résultant de plus longs ARN double-brins. La protéine RIG-I reconnaît les ARN simple ou double-brins 5’ triphosphate et non coiffés. L’activation de ces différentes protéines PRR, conduit à une transduction de signaux intracellulaires aboutissant à l’activation de facteurs de transcription et à l’expression d’interférons de type I (IFN- α et IFN- β) et de cytokines pro-inflammatoires (Figure 3).

Il est à noter également que TLR7 et TLR8 reconnaissent les ARN simple-brins de manière dépendante de la séquence. Certains motifs de séquence sont donc particulièrement immunostimulateurs, comme la séquence UGUGUU (Judge et al. 2005) ou la séquence GUCCUCAA (Hornung et al. 2005). L’introduction de certaines modifications chimiques des nucléotides, comme les 2’-déoxy, 2’-O-méthyl ou LNA (voir Figure 5), peut réduire l’activation de la réponse immune, de manière dépendante de la position de ces modifications dans la séquence.

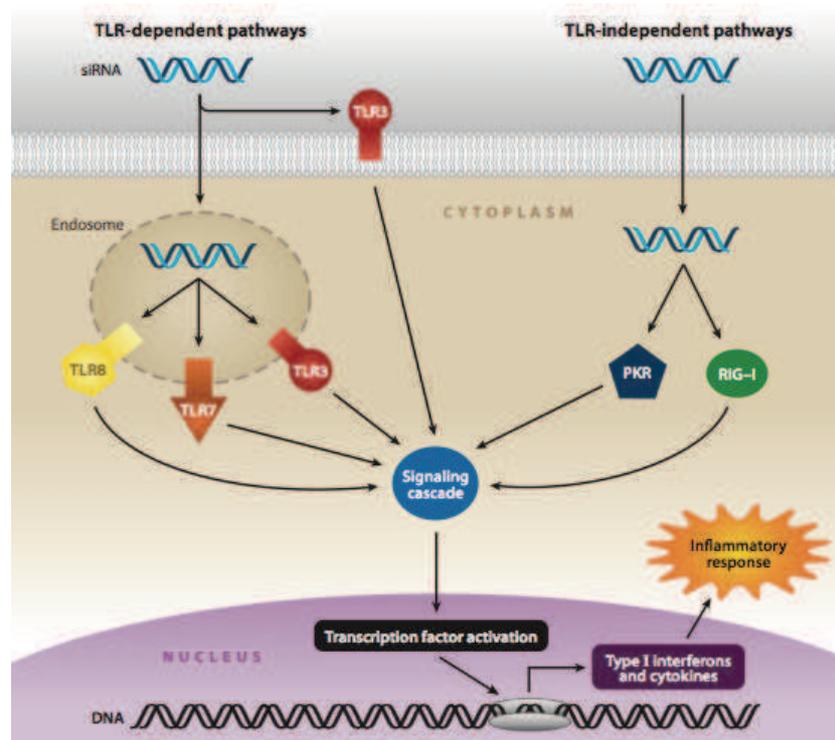


Figure 3 : PRR (Pattern Recognition Receptors) impliqués dans la reconnaissance des siARN et réponse immunitaire innée associée (d'après Whitehead et al. 2011).

Les protéines cytoplasmiques PKR et RIG-I, ainsi que certains TLR (Toll-Like Receptors) reconnaissent les siARN et induisent une réponse inflammatoire en stimulant la transcription d'interférons de type I et de cytokines inflammatoires *via* activation d'une cascade de signalisation spécifique.

Enfin, le dernier point limitant pour un développement clinique des siARN est leur internalisation cellulaire. En effet, les siARN, qui sont gros (environ 13 kDa) et négativement chargés, traversent difficilement la membrane plasmique lipophile. Il est donc nécessaire d'utiliser un système transporteur pour internaliser, voire vectoriser (c'est à dire cibler certains types cellulaires) les siARN. Bien sûr, la nature de ce transporteur influence les différents points évoqués dans cette partie (stabilité, off-target et immunostimulation). Les différentes stratégies pour augmenter l'internalisation cellulaire des siARN seront abordées dans le second chapitre de cette introduction.

1. 4. Développement clinique

Plus de dix ans après la découverte de l'ARNi, une vingtaine de siARN ou shARN sont en développement clinique (phases I ou II), mais aucun n'a encore été approuvé sur le marché (Burnett & Rossi 2012). Des progrès ont été apportés pour optimiser la distribution

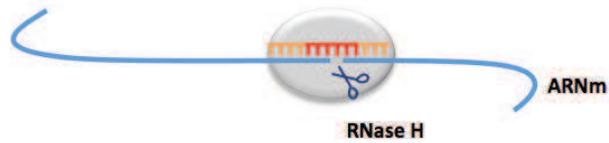
aux tissus cibles, l'internalisation cellulaire et l'efficacité, dans des limites acceptables de toxicité. Parmi les premiers candidats à entrer en essais cliniques, beaucoup étaient des siARN sans aucune modification chimique, et près de la moitié des essais cliniques utilisent des siARN nus, non vectorisés (Watts & Corey 2012). Le plus avancé d'entre eux, le Bevasiranib (Opko Health), un siARN dirigé contre le VEGF pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, a été stoppé en phase III en 2009 pour des raisons de manque d'efficacité. Le composé le plus avancé en cours de développement clinique (phase IIb) est un siARN non modifié (ALN-RSV01 ; Alnylam/Cubist), dirigé contre la nucléocapside du virus RSV (Respiratory syncytial Virus) pour traiter les infections des patients ayant reçu une transplantation pulmonaire (injection intranasale ou par inhalation).

I. 2. Les oligonucléotides antisens

2. 1. Modifications chimiques et mécanismes associés

L'utilisation des oligonucléotides antisens ADN phosphodiester (PO) est limitée principalement par leur dégradation rapide par les nucléases dans les milieux biologiques (sang ou milieu intracellulaire). Un oligonucléotide non modifié est dégradé en quelques heures dans 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Stein et al. 2008) et sera donc probablement complètement dégradé avant d'atteindre sa destination. Afin d'augmenter la stabilité, des oligonucléotides modifiés chimiquement ont été développés, n'étant pas reconnus comme substrats pour les nucléases et possédant donc une plus grande résistance à la dégradation nucléolytique. La nature de ces modifications affecte le mode d'action des oligonucléotides, qui fait intervenir deux mécanismes : le clivage catalytique du transcrit ou un blocage stérique de la fonction des ARN (Figure 4). Les différentes générations de modification des oligonucléotides seront décrites dans cette partie, ainsi que les limites et le développement clinique qui leur sont associés.

A. Clivage par la RNase H



B. Blocage stérique de la traduction

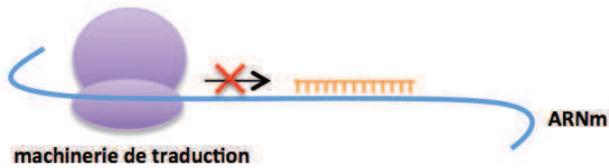


Figure 4 : Mécanismes d'action des oligonucléotides antisens.

A) Clivage de l'ARNm par la RNase H au sein de l'hétéroduplexe oligonucléotide/ARN. B) Blocage stérique de l'initiation ou de l'élongation de la traduction.

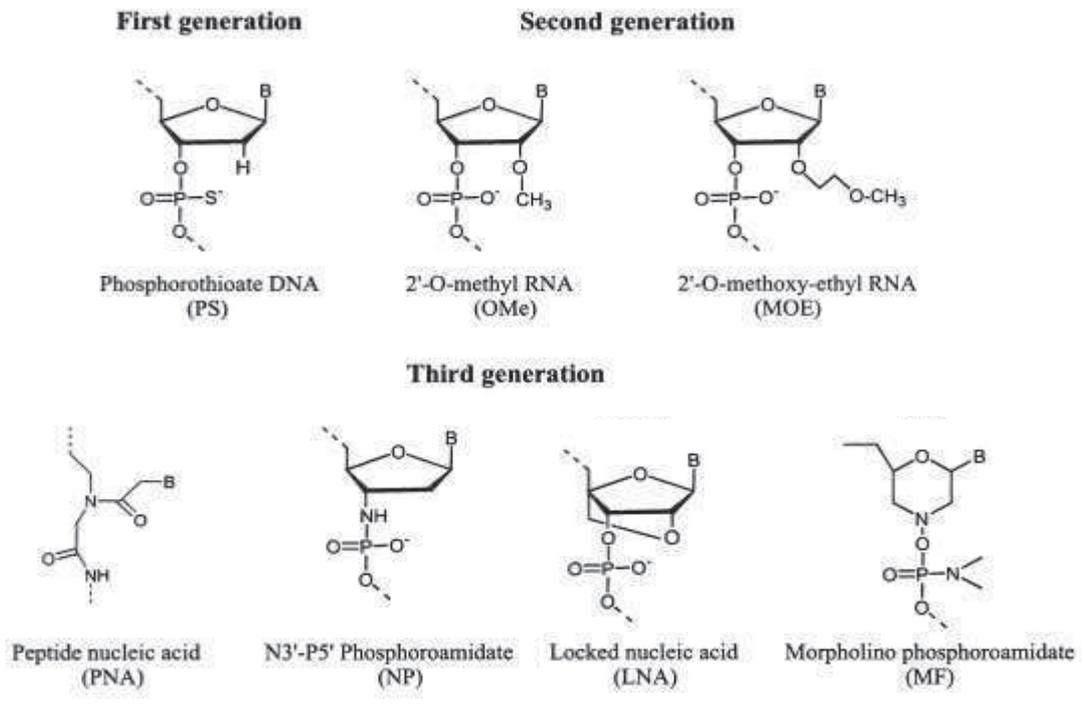


Figure 5 : Structures chimiques des oligonucléotides antisens (d'après Kurreck 2003).

a) 1^{ère} génération

La première génération d'oligonucléotides modifiés chimiquement est composée principalement des Phosphorothioates (PS), dans lesquels un atome d'oxygène du groupement phosphate (non engagé dans la liaison phosphodiester) a été remplacé par un atome de soufre (Figure 5). Cette modification augmente drastiquement la stabilité de l'oligonucléotide dans les cellules en culture et *in vivo*, la demi-vie d'un PS étant approximativement de neuf-dix heures dans le sérum humain contre environ une heure pour un oligonucléotide non modifié (Kurreck et al. 2002; Kurreck 2003). Les PS ont été synthétisés pour la première fois en 1969 par Eckstein et ses collègues (De Clercq et al. 1969) et plusieurs molécules PS ont progressé dans des essais cliniques depuis, certaines étant aujourd'hui en phase III. Seulement une, le Fomivirsen ou Vitravene[®] (ISIS/Novartis), a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (en 1998), pour le traitement des rétinites induites par le cytomégalo virus (CMV), par injection intraoculaire (<http://www.isispharm.com>). L'expérience des essais pré-cliniques et cliniques utilisant les PS a permis de mettre en évidence certains inconvénients relatifs à l'utilisation de ces oligonucléotides. Tout d'abord, leur fixation non spécifique sur des protéines cellulaires, notamment avec des protéines qui interagissent avec des poly-anions tels que l'héparine (laminine, fibronectine, bFGF (basic fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor...)) engendre des effets secondaires toxiques (Guvakova et al. 1995; Dias & Stein 2002). De même, les PS peuvent interagir avec certains récepteurs cellulaires, tels que les récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et perturber leur activation (Rockwell et al. 1997). Il a aussi été montré que les PS peuvent inhiber les ADN polymérases humaines et les RNase H1 et H2 (à fortes concentrations) (Gao et al. 1991). Leur fixation non spécifique à des protéines plasmatiques (héparine, thrombine ou albumine) pourrait être bénéfique d'un point de vue pharmacocinétique puisqu'elle leur conférerait une demi-vie dans le sérum augmentée, une protection vis-à-vis de la filtration rénale, ainsi qu'une pénétration facilitée dans les tissus (Kurreck 2003; Bennett & Swayze 2010). Enfin, l'affinité des PS pour l'ARN est légèrement diminuée, en comparaison de celle de leurs analogues PO (réduction de la température de demi-association, ou T_m , de 0,5°C par nucléotide pour l'association d'un PS à son ARN complémentaire, en comparaison au PO) (Crooke 1999). Ceci est compensé en partie par une légère augmentation de la spécificité d'hybridation des PS sur l'ARN.

Les oligonucléotides non modifiés (PO) et PS agissent sur l'expression post-transcriptionnelle des gènes, en recrutant la RNase H, enzyme constitutive et nucléaire, connue pour son rôle dans la réplication de l'ADN (dégradation des amorces d'ARN). Cette enzyme clive le brin d'ARN au sein d'un duplexe ARN/ADN (Stein & Hausen 1969). Chez les mammifères, la RNase H spécifique recrutée aux duplexes Oligonucléotides/ARN est la RNase H1 (Wu et al. 2004). Cette enzyme se lie à l'hétéroduplexe ARN/ADN et clive l'ARN, en présence de cations divalents (Mg^{2+} , Mn^{2+}), à une position variable entre le septième et le dixième nucléotide à partir de l'extrémité 5' de l'ARN. Les oligonucléotides PO et PS dirigés contre n'importe quelle région de l'ARNm (5' ou 3' UTR ou région codante) peuvent ainsi provoquer le clivage puis la dégradation du transcrite et inhiber l'expression de la protéine.

b) 2^{ème} génération

Dans le but d'améliorer l'affinité pour l'ARN, la résistance aux nucléases et les paramètres pharmacocinétiques des oligonucléotides, d'autres modifications ont été introduites. Les oligonucléotides dits de seconde génération comportent une modification (alkylation) en 2' du sucre et sont appelés 2'-*O*-méthyl (2'-OMe ; comportent un groupe methyl) et 2'-*O*-méthoxyethyl (2'-MOE ; comportent un groupement methoxyethyl) (Figure 5). Ces modifications confèrent une bonne résistance aux nucléases (demi-vie d'environ 12 heures), une toxicité réduite par rapport aux PS et une affinité pour l'ARN augmentée en comparaison aux PO et PS isoséquentiels. La *Tm* des 2'-OMe est augmentée de moins d'1°C par modification par rapport aux PO (Kurreck et al. 2002), contre une augmentation de 2°C par modification 2'-MOE (Bennett & Swayze 2010).

Ces oligonucléotides de seconde génération, en revanche, ne peuvent activer la RNase H. En effet, les études mécanistiques et structurales sur la RNase H ont montré l'importance de trois paramètres pour permettre la reconnaissance et le clivage de l'ARN cible (Zamaratski et al. 2001). Tout d'abord, l'accessibilité du groupement 2'-OH de l'ARN est cruciale pour le clivage. Toute modification à proximité du petit sillon doit donc être évitée pour préserver l'accessibilité de ce groupe 2'-OH. De plus, la largeur du petit sillon de l'hélice formée par le duplexe Oligonucléotide/ARN est cruciale pour la reconnaissance par la RNase H. Celle-ci doit être suffisamment large pour s'accommoder au site de clivage de l'enzyme, ce qui pourrait expliquer en partie la spécificité de l'enzyme pour les duplexes ARN/ADN.

Structurellement, les duplexes ADN/ADN sont de forme B, dont la largeur du petit sillon varie entre 3 et 7,4 Å. L'hélice formée par l'hétéroduplexe ARN/ADN comporte un petit sillon beaucoup plus large (entre 8,9 et 10,5 Å), plus proche de celui adopté par les duplexes ARN/ARN (de 9,3 à 10,8 Å : forme A). La discrimination vis-à-vis de la forme A pourrait dépendre de la rigidité des deux brins dans les duplexes ARN/ARN (Mangos et al. 2003). En effet, la flexibilité de l'oligonucléotide doit permettre une adaptation conformationnelle nécessaire au clivage par l'enzyme. Ainsi, les modifications en 2' du sucre des oligonucléotides de seconde génération ne sont pas compatibles avec un clivage par la RNase H.

Selon leur cible, ces oligonucléotides inhibent par blocage stérique le métabolisme de divers ARN : inhibition de la traduction des ARNm (Figure 4B), interférence avec l'épissage des pré-ARNm, ou blocage de la fonction des miARN. Ce mécanisme d'action a été montré pour la première fois en 1997 (Baker et al. 1997), avec un oligonucléotide 2'-MOE dirigé contre la région de la coiffe en 5' du transcrite de ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), qui bloque la formation du complexe 80S d'initiation de la traduction, sans interférer avec l'épissage ou le transport nucléo-cytoplasmique des transcrits.

Alternativement, des oligonucléotides antisens dits 'gapmers' peuvent être utilisés pour induire un clivage de l'ARNm par la RNase H. Ces oligonucléotides comportent des modifications de 2^{ème} ou 3^{ème} génération à leurs extrémités, de manière à augmenter la stabilité vis-à-vis des nucléases ainsi que l'affinité pour l'ARN, et une fenêtre de 6-8 nucléotides PO ou PS contigus minimum (Kurreck et al. 2002), de manière à recruter la RNase H.

Une quinzaine d'oligonucléotides 2'-OMe ou 2'-MOE, dont la grande majorité sont des gapmers, sont actuellement en essais cliniques (principalement en phase I ou II). Un gapmer 2'-MOE/PS, le Mipomersen (Genzyme/ISIS), a reçu l'autorisation de mise sur le marché en janvier 2013 (<http://www.kynamro.com>). Cet oligonucléotide cible l'ARNm de l'apolipoprotéine B100 (APOB100) et est administré en injections sous-cutanées aux patients atteints de formes familiales d'hypercholestérolémie. Il s'agit du premier oligonucléotide antisens délivré en systémique à atteindre le marché.

c) 3^{ème} génération

Afin d'améliorer les propriétés antisens des oligonucléotides, un grand nombre d'analogues de l'ARN ou de l'ADN ont été développés et constituent la troisième génération d'oligonucléotides antisens modifiés. Les modifications chimiques concernent les liaisons phosphodiester, le sucre ou les nucléotides. Seules certaines de ces modifications, parmi les plus prometteuses, seront décrites ici.

Les Locked Nucleic Acids (LNA) :

Les LNA, initialement synthétisés en 1998 par Imanishi et Wengel (Ers et al. 1998; Koshkin et al. 1998), sont des ribonucléotides contenant un pont méthylène reliant l'oxygène 2' du ribose avec le carbone en 4' (Figure 5), qui leur impose une conformation C3'-endo et par conséquent une flexibilité restreinte. Ces molécules possèdent des propriétés intéressantes pour leur résistance élevée aux nucléases, mais surtout pour leur affinité d'hybridation exceptionnelle vis-à-vis de l'ADN et de l'ARN. Cette augmentation d'affinité est plus importante vis-à-vis de l'ARN, et la T_m est classiquement augmentée de 5 à 7°C par base LNA (Stein et al. 2008). La plus grande augmentation de T_m est observée lorsque les nucléotides LNA sont introduits dans un oligonucléotide PS, qui confère une élévation de la T_m de 9 à 10°C par modification. L'introduction de nucléotides LNA dans un oligonucléotide conduit à un changement conformationnel du duplexe vers une hélice de type A. De plus, les modifications LNA induisent un changement conformationnel des déoxynucléotides avoisinants, ce qui explique que l'insertion de seulement quelques nucléotides LNA suffit à conférer une très haute affinité à l'oligonucléotide entier.

Les modifications LNA peuvent être introduites sous deux formes dans un oligonucléotide, aboutissant à un oligonucléotide dit 'mixmer', ou à un oligonucléotide dit 'gapmer'. Les mixmers LNA sont des oligonucléotides dans lesquels des nucléotides LNA sont dispersés tout le long de la séquence, à raison d'un LNA tous les deux ou trois nucléotides. Tout comme la grande majorité des oligonucléotides comportant des modifications en 2' du ribose, les LNA n'activent pas la RNase H et peuvent agir selon un mécanisme de blocage stérique, sur la traduction (Fluiter et al. 2003) ou l'épissage (Aartsma-Rus et al. 2004), ou en interférant avec la fonction d'un miARN (Lanford et al. 2010). Les oligonucléotides LNA gapmers sont constitués d'un segment central d'ADN ou de PS et de deux segments de LNA aux extrémités de l'oligonucléotide. Une séquence centrale de 7-8

nucléotides d'ADN ou de PS confère la possibilité de clivage de l'ARN cible par la RNase H (Kurreck 2003).

La première utilisation *in vivo* d'oligonucléotides LNA, gapmer et mixmer, a montré une forte efficacité chez le rat, accompagnée d'une bonne stabilité et de l'absence d'effets toxiques (Wahlestedt et al. 2000). Trois oligonucléotides LNA gapmers sont aujourd'hui en essais cliniques dans le domaine de l'oncologie (Bennett & Swayze 2010). Un LNA mixmer, le miravirsén, est entré en essai clinique de phase II en 2010 pour le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C. Cet oligonucléotide, développé par Santaris Pharma A/S, cible le micro ARN miR-122 et est le premier oligonucléotide ciblant un micro-ARN à entrer en essais cliniques (santaris.com).

Les Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers (PMO) :

Les PMO sont des analogues non ioniques de l'ADN dans lesquels le sucre est remplacé par un cycle morpholino et les liaisons phosphodiester ont été remplacées par des liaisons phosphorodiamidates (Figure 5). Leur synthèse a été décrite en 1997 (Summerton & Weller 1997). Ces oligonucléotides n'étant pas chargés, les interactions non désirables avec les protéines du sérum sont limitées. Ils ont une bonne stabilité vis-à-vis des nucléases mais leur affinité pour l'ARN est similaire à celle d'un oligonucléotide ADN isoséquentiel, et donc bien plus faible que celle de la plupart des autres oligonucléotides de troisième génération. Pour cette raison, leur taille est généralement comprise entre 18 et 31 bases. Les PMO n'activent pas la RNase H et agissent par blocage stérique de l'initiation de la traduction, redirection de l'épissage ou blocage de miARN. Ils sont très utilisés comme outils en biologie du développement ou pour comprendre la fonction de certains gènes dans des maladies génétiques. En effet, ces oligonucléotides sont facilement microinjectables dans des embryons d'organismes modèles tels que le xénope ou le poisson zèbre pour inhiber l'expression d'un ARN messager à un stade de développement (Nasevicius & Ekker 2000). Plusieurs PMO sont actuellement en cours de développement clinique. Parmi eux, le plus avancé est l'eteplirsén (AVI-4658, Sarepta Therapeutics), un PMO dirigé contre l'ARN pré-messager de la dystrophine, actuellement en phase II (sareptatherapeutics.com). Cet oligonucléotide provoque un saut d'exon permettant de restaurer l'expression d'une dystrophine fonctionnelle chez les patients atteints de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD).

Les N3'→P5' Phosphoramidates (NP) :

Les NP comportent un groupement amine en position 3' du ribose, qui remplace l'oxygène (figure 5) (Gryaznov et al. 1995). Ils ont à la fois d'une forte affinité pour l'ARN et d'une bonne résistance aux nucléases (Gryaznov et al. 1996). Ils n'activent pas la RNase H mais sont de bons agents antisens bloqueurs stériques en cellules et *in vivo* (Skorski et al. 1997; Faria et al. 2001). Une étude originale et intéressante rapporte l'utilisation d'un oligonucléotide 13 mer N3' → P5'-thio-phosphoramidate conjugué à un lipide et dirigé contre la composante ARN de la télomérase humaine, pour inhiber l'activité télomérase dans des cellules tumorales et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffes (Dikmen et al. 2005). Cette étude a été controversée par des travaux en 2007, qui ont montré que ces effets antimétastatiques résulteraient plutôt, au moins en partie, d'un effet cellulaire antiadhésif (Jackson et al. 2007). Cet oligonucléotide est actuellement en développement clinique de phase II (geron.com) sous le nom d'Imetelstat (GRN163L), pour le traitement de deux tumeurs solides et de deux tumeurs hématologiques.

Les Peptide Nucleic Acids (PNA) :

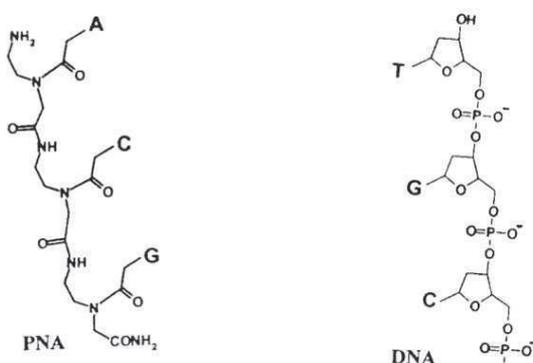


Figure 6 : Structures chimiques comparées des PNA et de l'ADN (d'après Ray and Norden 2000).

Les PNA, décrits en 1991 par l'équipe de P.E. Nielsen (Nielsen et al. 1991), sont des analogues structuraux d'acides nucléiques dont le squelette sucre-phosphate a été remplacé par un squelette pseudo-peptidique d'unités 2-aminoéthylglycine, sur lequel sont greffées des bases azotées (Figure 6). Leurs extrémités amino-terminale et carboxy-terminale correspondent respectivement aux extrémités 5' et 3' des acides nucléiques. Les angles et les distances entre les bases sont les mêmes que pour l'ADN, ce qui permet à ces molécules de

s'hybrider aux acides nucléiques. Les PNA n'activent pas la RNase H et sont très stables dans les milieux biologiques car ils ne sont substrats ni des protéases, ni des nucléases, du fait de leur structure mixte. Leur affinité pour les acides nucléiques est très élevée. Cependant, ces molécules neutres sont moins solubles que les acides nucléiques négativement chargés. L'apport de charges positives *via* l'ajout d'une ou deux lysines en 3' permet classiquement d'augmenter la solubilité des PNA (Ray & Nordén 2000).

Formation de duplexes

Les PNA peuvent s'hybrider en duplexe sur un ARN ou un ADN simple-brin, avec une affinité plus importante que les duplexes ARN/ADN ou ADN/ADN correspondants (Larsen et al. 1999). La stabilité globale d'un tel duplexe dépend principalement du contenu en GC et de sa longueur. L'affinité des PNA est plus importante pour l'ARN que pour l'ADN. Ceux-ci peuvent s'hybrider par liaisons Watson-Crick de manière parallèle ou anti-parallèle (l'extrémité N-ter du PNA faisant face à l'extrémité 3' de l'acide nucléique ciblé), cette dernière orientation étant la plus stable (Egholm et al. 1993). Leur spécificité d'appariement est très forte, la stabilité thermique étant considérablement diminuée en présence d'un ou plusieurs mésappariements (Egholm et al. 1993). Les PNA peuvent également former des duplexes PNA/PNA extrêmement stables.

Formation de triplexes

Deux molécules de PNA oligopyrimidiques peuvent former un triplex avec une molécule d'acide nucléique oligopurique en mettant en jeu à la fois des liaisons hydrogène Watson-Crick et des liaisons Hoogsteen (Figure 7). Les bases de PNA impliquées dans ce type de liaisons sont les thymines (triplets T.AT) et les cytosines protonnées en milieu acide (pH compris entre 5 et 5,5) (triplets C⁺.GC).

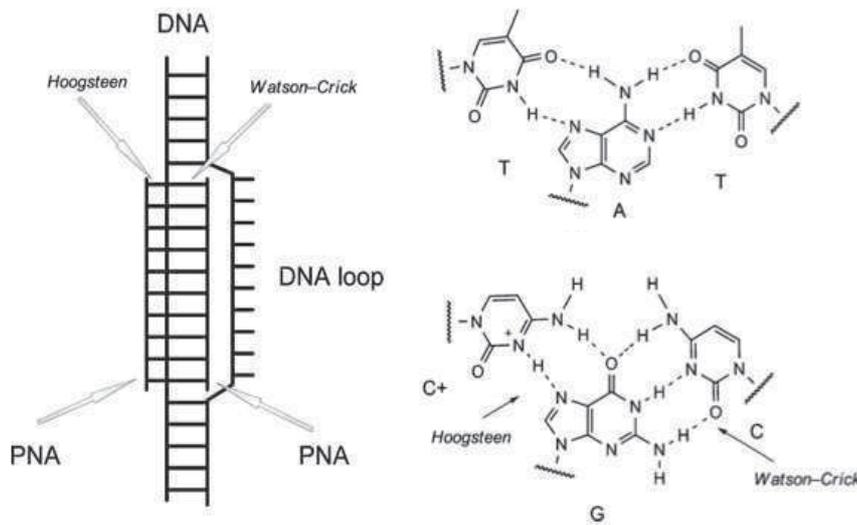


Figure 7 : Fixation des PNA sur une séquence d'ADN double-brin homopurique par un mécanisme d'invasion de brin (d'après Nielsen 2010).

Un premier PNA homopyrimidique se lie au brin complémentaire d'ADN par liaisons Watson-Crick. Un second PNA se lie à ce complexe PNA :ADN par liaisons Hoogsteen, en formant ainsi un triplex, résultant en une structure de type '*P-loop*'. Les triplets de bases T·A·T et C⁺·G·C sont impliqués dans la formation de tels triplexes.

Les PNA peuvent former des triplexes avec l'ADN double-brin par un mécanisme d'invasion de brin. En effet, plutôt que de former une triple hélice classique en se liant dans le grand sillon de l'ADN, deux PNA homopyrimidiques s'hybrident sur le brin homopurine de l'ADN, l'un par liaisons Watson-Crick, l'autre par liaisons Hoogsteen. Le brin d'ADN homopyrimidique est écarté et forme une boucle simple-brin. Le complexe PNA₂/ADN résultant forme ainsi une structure appelée '*P-loop*' (Nielsen 2010) (Figure 7). La configuration antiparallèle est la plus favorable pour la formation du duplexe Watson-Crick, tandis qu'une configuration parallèle est plus stable pour la fixation du second PNA par les liaisons Hoogsteen. D'autres structures, moins favorables ou nécessitant l'utilisation de PNA modifiés chimiquement, sont également possibles entre les PNA et l'ADN double-brin, telles qu'une invasion en duplexe ou double duplexe (avec des PNA pseudo-complémentaires). La fixation des PNA sur l'ADN (stratégie dite '*antigène*') peut avoir diverses applications telles que l'activation (Liu et al. 2002) ou l'inhibition (Hu & Corey 2008) de la transcription ou l'inhibition de la réplication (Taylor et al. 1997).

Les PNA peuvent également se fixer aux ARN en duplexe ou en triplex (pour les PNA ciblant des séquences polypuriques) et agir en tant que bloqueurs stériques selon une

stratégie antisens. Les structures de type triplexes (PNA)₂/ARN ont une très forte stabilité thermique, avec des *T_m* supérieures à 70°C, dans le cas de PNA décimers (Knudsen & Nielsen 1996). La première utilisation des PNA comme agents antisens dans les cellules eucaryotes, concerne un PNA dirigé contre l'ARNm de l'antigène T du SV40 et microinjecté dans des cellules en culture, conduisant à une inhibition de l'antigène T (Hanvey et al. 1992). Les mécanismes responsables de cette inhibition ne sont cependant pas clairs : le PNA pouvant se fixer à l'ADN ou à l'ARN, un effet sur la transcription ne pouvait être exclu. Depuis, les PNA ont été largement utilisés en cellules et *in vivo* pour inhiber la traduction (Margus Pooga et al. 1998), bloquer les miARN (Fabani et al. 2010) et interférer avec l'épissage (Ivanova et al. 2008). Cependant, aucun PNA n'est aujourd'hui en développement clinique, leur utilisation étant limitée principalement par leur faible internalisation cellulaire.

2. 2. Les applications

Les oligonucléotides antisens peuvent moduler l'expression post-transcriptionnelle des gènes, à différents niveaux. Les principales applications seront décrites dans ce paragraphe.

a) Inhibition de la traduction

Les oligonucléotides antisens peuvent inhiber la traduction par deux mécanismes distincts : le clivage de l'ARNm ou le blocage stérique de la traduction (Figure 4).

Le premier mécanisme est dépendant de la RNase H, enzyme ubiquitaire qui hydrolyse le brin d'ARN dans le duplexe ARN/Oligonucléotide ADN. Cette enzyme ne peut être recrutée que par les oligonucléotides PO ou PS, qui peuvent ainsi inhiber l'expression protéique en ciblant n'importe quelle région du transcrit. Des inhibitions très efficaces (> 80%) de la traduction d'une protéine sont générées par cette approche (Dias & Stein 2002). Du fait de leur structure, les oligonucléotides de seconde et troisième génération ne peuvent pas activer la RNase H. Cependant, il est possible de concevoir des oligonucléotides chimériques, dits gapmers, comportant des extrémités avec des modifications de seconde ou troisième génération (2'-MOE, 2'-OMe, LNA, PNA...) et une fenêtre centrale d'oligonucléotides ADN ou PS.

Les oligonucléotides de seconde et troisième générations agissent selon un mode indépendant de la RNase H et sont nommés oligonucléotides bloqueurs stériques. En effet, ces oligonucléotides agissent en interférant physiquement avec la machinerie de traduction, au niveau de l'initiation ou de l'élongation de la traduction.

Les mécanismes exacts d'inhibition de l'initiation de la traduction semblent dépendre de la région exacte ciblée sur le transcrite (coiffe, 5'UTR, AUG ou premiers exons). En 1997, Baker et al. montrent que des oligonucléotides 2'-O-(2-méthoxy)éthyl dirigés contre la région de la coiffe en 5' du transcrite de ICAM-1 (human intercellular adhesion molecule 1), inhibent l'expression de la protéine dans des cellules HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) en interférant stériquement avec la formation du complexe d'initiation 80S de la traduction, sans effet sur l'épissage ou inhibition du transport de l'ARN (Baker et al. 1997). Il a été montré que les premiers nucléotides après l'AUG sont également importants pour l'initiation de la traduction. En effet, l'association des monosomes est inhibée si l'oligonucléotide s'étend jusqu'au 18^{ème} nucléotide après l'AUG (Liebhaber et al. 1992), le complexe ribosomique 80S couvrant de 14 à 20 nucléotides de part et d'autre de l'AUG (Kozak 1989). Les oligonucléotides bloqueurs stériques sont également efficaces dans des systèmes bactériens ou viraux. Une application intéressante concerne le ciblage de l'ARN du virus de l'hépatite C (HCV), qui contient une structure IRES en 5'UTR, nécessaire pour la traduction et la réplication virale. Des oligonucléotides 17 mer PNA et LNA sont efficaces pour envahir des séquences critiques au sein de l'IRES et inhiber la traduction d'un ARN rapporteur dans des cellules rénales de singe (Nulf & Corey 2004).

Dans le cas où l'oligonucléotide est dirigé contre la région codante de l'ARNm, il est possible d'induire l'inhibition de l'élongation de la traduction, par arrêt de la machinerie de traduction par l'oligonucléotide. L'avantage de cette stratégie consiste en la possibilité de générer une protéine tronquée au site de fixation de l'oligonucléotide. Si la stabilité de cette protéine tronquée est suffisamment bonne dans la cellule, elle pourrait alors agir comme dominant négatif, c'est-à-dire comme une version inactive de la protéine normalement traduite (voir Chapitre III). La difficulté du blocage stérique de l'élongation de la traduction repose sur l'activité hélicase des ribosomes lors de la traduction. Cette activité hélicase a pour fonction de défaire les structures secondaires des ARNm pour permettre leur traduction (Takyar et al. 2005). Pour cette raison, seuls les oligonucléotides formant des complexes de type triplexe ou covalents sur la séquence cible de l'ORF sont efficaces.

Des agents pontants peuvent être couplés aux oligonucléotides pour générer une liaison covalente entre les oligonucléotides et leur cible. Le psoralen est un composé

photoréactif permettant la formation irréversible d'adduits covalents entre l'oligonucléotide et sa cible après irradiation aux UV (366 nm). L'élongation de la traduction par des oligonucléotides 2'-OMe couplés à un psoralen est possible *in vitro*, dans du lysat de réticulocytes de lapin (Johansson et al. 1994). Egalement, le *trans*-diaminedichloroplatine peut être utilisé pour lier coalement l'oligonucléotide sur sa cible. Le couplage de cette molécule à un oligonucléotide contenant deux guanines espacées par un nucléotide non guanine (triplet GNG), permet la formation d'un pont intramoléculaire entre les deux guanines. Ce pont peut se réarranger spontanément en pont intermoléculaire lorsque l'oligonucléotide s'apparie avec son ARN complémentaire. Ce réarrangement est encore plus efficace quand le triplet CNC de l'ARN cible est remplacé par un doublet UA ou CA. Il a ainsi été montré qu'un oligonucléotide 2'-OMe couplé à ce *trans*-platine inhibe efficacement l'élongation de la traduction de l'oncogène Ha-ras *in vitro* et dans des cellules transformées (Boudvillain et al. 1997). De la même manière, des oligonucléotides 2'-OMe dirigés contre la séquence codante de l'ARNm de la protéine N du virus VSV (Vesicular Stomatitis Virus) inhibent l'élongation de la traduction *in vitro* lorsqu'ils sont conjugués au *trans*-platine (Gee et al. 1998). Les oligonucléotides 'pinces' sont constitués de deux oligonucléotides reliés par un bras de liaison et complémentaires d'une même séquence homopurique d'ARN. Ils sont capables de former un triplex bimoléculaire sur l'ARN, en engageant des liaisons Watson-Crick et Hoogsteen. Il a été montré qu'un oligonucléotide PS pince dirigé contre la région codante de l'oncogène *c-myc*, couplé au psoralen en 5', inhibe l'élongation de la traduction après irradiation aux UV dans des cellules de mélanome murin, conduisant à l'inhibition de la prolifération cellulaire (Stewart et al. 2001). Ces approches sont toutefois limitées par la difficulté de transposer l'activation photochimique *in vivo* dans le cas du psoralen, et par la lenteur de la cinétique de formation des ponts intermoléculaires et la relativement faible spécificité dans le cas du pontage induit par le *trans*-platine (Boudvillain et al. 1997).

Certains PNA sont capables d'inhiber l'élongation de la traduction en l'absence de complexe covalent avec l'ARNm. Nielsen et Knudsen ont montré que seuls des PNA polypyrimidiques ou des PNA pinces sont capables d'arrêter l'élongation de la traduction dans un système de traduction *in vitro* de l'ARNm de l'acétyltransférase chloramphénicol, en formant probablement des structures de type triplex PNA₂/ARN (Knudsen & Nielsen 1996). Dans cette étude, les PNA composés de purines et de pyrimidines et ne formant *a priori* que des duplexes avec leur cible, ne sont pas efficaces pour inhiber l'élongation de la traduction. Ces derniers forment pourtant des duplexes très stables, avec des *Tm* parfois supérieures à celles des PNA polypyrimidiques efficaces pour arrêter l'élongation de la traduction. Les

auteurs concluent donc sur la nécessité d'une structure de type triplexe, bien que la stabilité ne soit pas le critère décisif pour l'efficacité d'inhibition de l'élongation de la traduction. La nécessité de cibler des séquences polypuriques constitue une limite à cette approche, le nombre de cibles étant alors restreint. Plusieurs études *in vitro* sur l'oncogène Ha-ras ont par la suite montré que des séquences mixtes de PNA (PNA constitués de purines et de pyrimidines) peuvent également inhiber efficacement l'élongation de la traduction en formant des triplexes PNA₂/ARN partiels (Dias et al. 2002; Sénamaud-Beaufort et al. 2003).

b) Modulation de l'épissage

L'épissage est un processus complexe de maturation de l'ARN pré-messager, consistant à éliminer les introns et à relier les exons entre eux, *via* la présence de séquences consensus au début et à la fin des introns. Ce processus est orchestré par le spliceosome, qui implique des centaines de protéines et de petits ARN (snARN) (Aartsma-Rus & van Ommen 2009). Les oligonucléotides antisens bloqueurs stériques peuvent être utilisés en thérapie de maladies génétiques résultant d'un défaut d'épissage. Ils peuvent en effet permettre de restaurer la production d'une protéine fonctionnelle ou partiellement fonctionnelle en stimulant ou en masquant un site d'épissage, par différents mécanismes (récapitulés sur la Figure 8).

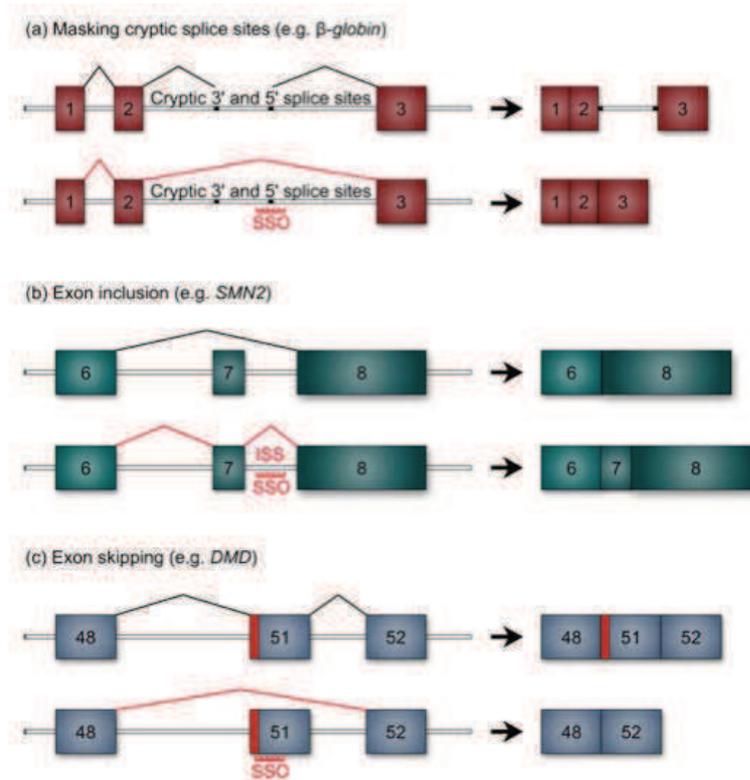


Figure 8 : Mécanismes de correction d'épissage par les oligonucléotides antisens bloqueurs stériques (d'après El Andaloussi 2012).

(a) Blocage de sites cryptiques d'épissage ; exemple du gène de la β -globine : des mutations dans l'intron 2 génère des sites cryptiques d'épissage conduisant à l'inclusion d'une partie de l'intron dans l'ARNm mature. Le blocage d'un site cryptique avec un oligonucléotide permet de restaurer un épissage correct. (b) Inclusion d'exon ; exemple du gène SMN2 : une mutation dans le gène inhibe la reconnaissance de l'exon 7 par le spliceosome et conduit à l'exclusion de cet exon dans l'ARN épissé. Le ciblage de certaines séquences par des oligonucléotides permet de stimuler l'inclusion de l'exon 7. (c) Saut d'exon ; exemple du gène de la dystrophine (Dystrophie Musculaire de Duchenne) : des délétions d'exons (ici 49 et 50) conduisent à la formation de transcrits comportant un décalage de phase de lecture et à l'expression d'une protéine non fonctionnelle. Le ciblage d'une séquence au sein de l'exon 51 masque la reconnaissance de cet exon et entraîne son exclusion dans le transcrit mature, permettant de restaurer un cadre de lecture correct pour l'expression d'une protéine semi-fonctionnelle. SSO : Splice Switching Oligonucleotide.

(a) Blocage de sites cryptiques d'épissage

Cette stratégie a été développée dans le cas de maladies liées à des mutations dans des introns, qui créent ou activent un site d'épissage dit cryptique, c'est-à-dire inactif dans les conditions normales. Ceci a pour conséquence l'inclusion d'un fragment intronique dans l'ARNm épissé, modifiant alors le cadre de lecture et conduisant donc à la production d'une protéine inactive. Le ciblage de ce site cryptique d'épissage avec des oligonucléotides antisens permet de restaurer un épissage normal et l'expression d'une protéine fonctionnelle. Les exemples les plus connus sont la mucoviscidose (gène CFTR) et la β -thalassémie (gène de la β -globine). La β -thalassémie est causée par des mutations dans le gène de la β -globine.

La β -globine étant une sous-unité de l'hémoglobine, il en résulte une production insuffisante d'hémoglobine pour acheminer l'oxygène dans le sang. De plus, l'excès d' α -globine, produite pour compenser, endommage les hématies. Les mutations les plus courantes induisent un épissage aberrant, conduisant à une mauvaise traduction de la β -globine. Ces mutations sont principalement dans l'intron 2 du gène (positions 654, 705 et 745) et activent un site d'épissage en amont. L'utilisation de ce site d'épissage par le spliceosome génère un ARNm contenant un morceau de l'intron 2 et l'apparition d'un codon stop prématuré (Figure 9). Il a été montré qu'un oligonucléotide PPMO (PMO couplé à un peptide pénétrant riche en arginines) dirigé contre la mutation 654 est très efficace *in cellulo*. L'injection systémique de cet oligonucléotide à des souris modèles de la maladie conduit à l'augmentation de la quantité d'hémoglobine dans le sang et améliore le nombre et la qualité de cellules érythroïdes (Svasti et al. 2009).

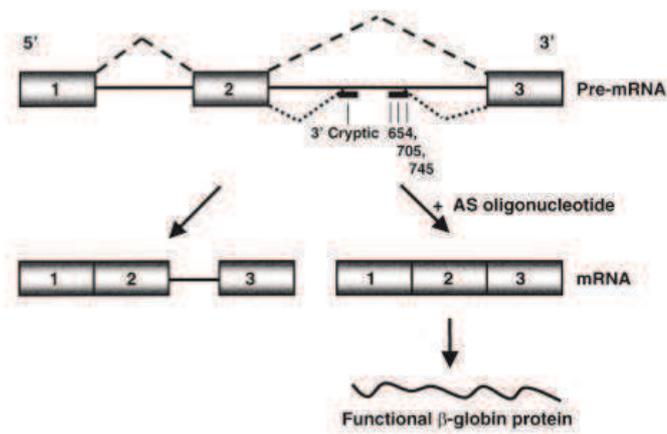


Figure 9 : Correction d'épissage de l'ARN pre-messager de la β -globine (d'après Mercatante et Kole 2000). Des mutations dans l'intron 2 du gène (positions 654, 705 et 745) génèrent un site aberrant d'épissage et activent un site cryptique d'épissage en amont, résultant en la production d'un transcrit non complètement épissé. Le ciblage de ces sites cryptiques d'épissage par un oligonucléotide antisens permet de masquer ces sites aberrants et de restaurer la production d'une protéine fonctionnelle.

(b) Inclusion d'exon

L'atrophie spinale musculaire est une maladie neuromusculaire autosomale récessive, causée par la présence de mutations dans le gène SMN1 (survival of motor neuron 1) qui code la protéine SMN, essentielle pour la préservation de l'intégrité des motoneurones. Chez l'humain, le gène SMN2 est un variant très proche du gène SMN1, produisant de très faibles quantités de protéine SMN, insuffisantes pour compenser la perte de fonction de SMN1. La

faible activité du gène SMN2 est due à une mutation qui inhibe la reconnaissance de l'exon 7 par le spliceosome, conduisant à l'exclusion de cet exon dans l'ARNm épissé et à la production d'une protéine SMN instable. Les séquences ESS (Exonic Splicing Silencers) sont des séquences exoniques qui inhibent l'inclusion d'un exon lors de l'épissage, *via* leur reconnaissance spécifique par des facteurs du spliceosome (Figure 10). Au contraire, les séquences ESE (Exonic Splicing Enhancers) sont des séquences exoniques qui stimulent l'inclusion de l'exon. De même, il existe des séquences régulatrices introniques, appelées ISS (Intronic Splicing Silencers) et ISE (Intronic Splicing Enhancers). La mutation supposée responsable de l'exclusion de l'exon 7 dans le gène SMN2 est une substitution de cytosine par une thymine, supprimant un ESE ou formant un ESS, ou les deux. Cependant, il existe d'autres E/ISS et E/ISE dans l'exon 7 et les introns l'encadrant (Aartsma-Rus & van Ommen 2009).

La stratégie thérapeutique la plus directe utilisant les oligonucléotides antisens consiste à cibler les séquences E/ISS afin de stimuler l'inclusion de l'exon 7. Un criblage de différentes séquences d'oligonucléotides 2'-MOE ciblant les introns 6 et 7 (Hua et al. 2008) et l'exon 7 a conduit à la mise en évidence de l'efficacité de certains oligonucléotides pour stimuler l'inclusion de l'exon 7 en cellules HEK293 et dans un modèle de souris transgéniques. Après injection systémique des oligonucléotides, ces souris présentent des niveaux plus élevés de protéine SMN dans le foie, les reins et les muscles. Cependant, aucun effet n'a pu être observé dans la moelle épinière. En effet, les oligonucléotides ne pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique, des injections directes dans la moelle épinière ou le système nerveux central sont nécessaires (Aartsma-Rus & van Ommen 2009).

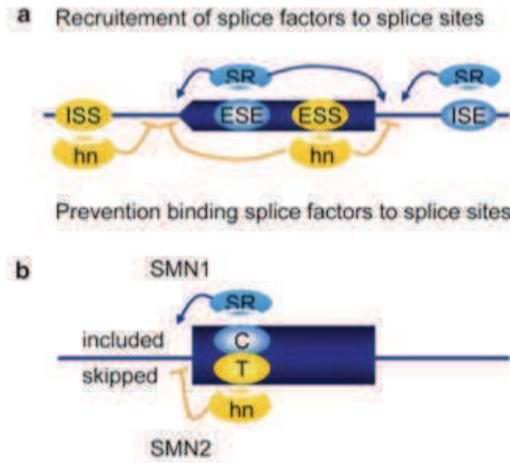


Figure 10 : Rôles des séquences exoniques ESS/ESE (Exonic Splicing Silencer/ Exonic Splicing Enhancer) et des séquences introniques ISS/ISE (Intronic Splicing Silencer/Intronic Splicing Enhancer) (d'après Aartsma-Rus et Van Ommen 2009).

a) Le début et la fin des exons sont reconnus par des protéines du spliceosome au niveau de séquences consensus stimulatrices ou inhibitrices de l'épissage, ESE et ESS respectivement. De telles séquences sont également présentes dans les introns, ISE et ISS. Les séquences stimulatrices (ESE et ISE) sont reconnues par des protéines SR (riches en sérine et arginines), tandis que les séquences inhibitrices sont reconnues par les protéines hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins). Ces protéines initient respectivement la stimulation ou l'inhibition de l'épissage de l'exon par interaction avec d'autres protéines de la machinerie d'épissage. b) La substitution d'une cytosine en thymine dans l'exon 7 du gène SMN2 transforme un ESE en ESS. Ceci a pour conséquence une inhibition de l'inclusion de cet exon dans le transcrit, passant par la reconnaissance de l'ESS par les protéines hnRNP.

(c) Saut d'exon

L'exemple le plus approprié pour illustrer la stratégie du saut d'exon est la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), qui constitue le plus fréquent et le plus sévère des troubles neuromusculaires, et pour lequel les oligonucléotides antisens bloqueurs stériques représentent la thérapie la plus prometteuse. Cette maladie est causée par une mutation dans le gène de la dystrophine, conduisant à une protéine non fonctionnelle. La dystrophine est une protéine modulaire comportant deux domaines terminaux reliant le cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire, séparés par un domaine central (Figure 11). Cette protéine est requise pour la stabilité des fibres musculaires pendant la contraction. Les mutations rencontrées chez les patients sont principalement des délétions, conduisant au décalage du cadre de lecture et à l'apparition de codons stop prématurés. De l'absence de dystrophine fonctionnelle, résulte une dégénérescence musculaire due à l'altération des fibres musculaires durant la contraction. Celles-ci sont progressivement remplacées par du tissu graisseux et conjonctif. La stratégie du saut d'exon consiste à masquer un site d'épissage avec un oligonucléotide bloqueur stérique, de manière à exclure un exon lors de l'épissage et ainsi restaurer le cadre de lecture et la

production d'une protéine plus courte dans son domaine central, mais partiellement fonctionnelle. Bien que les mutations diffèrent selon les patients, cette approche pourrait être appliquée chez 85% d'entre eux, certaines mutations ne pouvant être corrigées par saut d'exon (Kole et al. 2012). La mutation la plus courante est la délétion des exons 48-50, entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'exon 51. Le ciblage spécifique de cet exon par des oligonucléotides antisens permet son exclusion et la restauration du bon cadre de lecture (Figure 11).

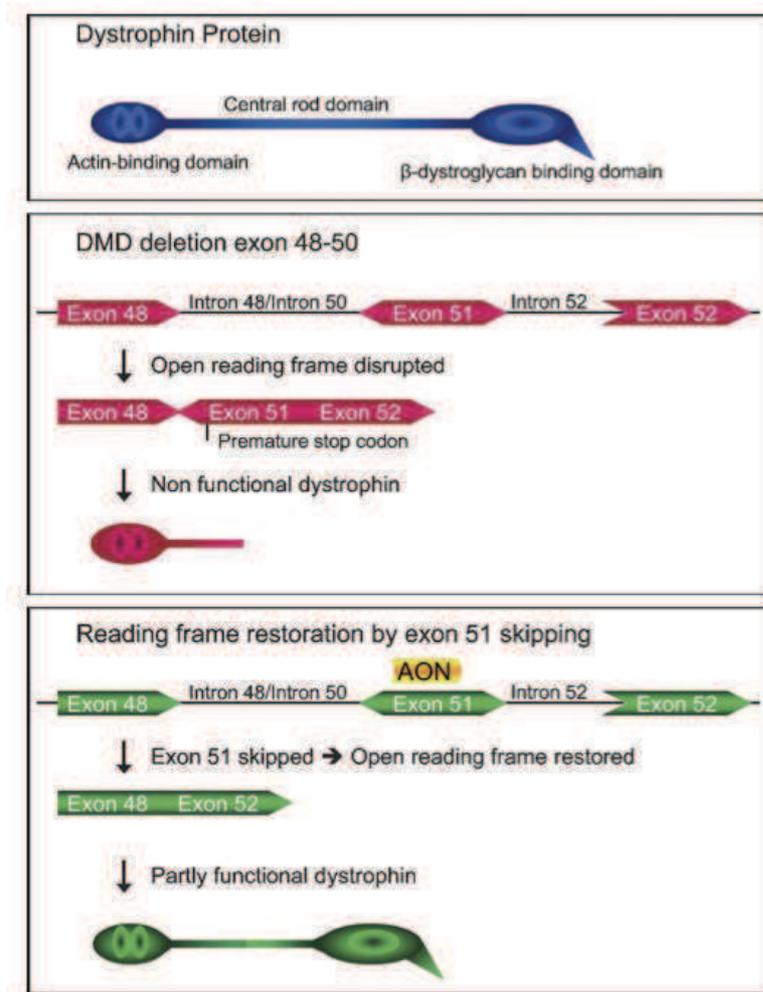


Figure 11 : Approche de saut d'exon dans le cadre de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)(d'après Aartsma-Rus et Van Ommen 2007).

La dystrophine est une protéine constituée d'un domaine N-terminal de fixation à l'actine et d'un domaine C-terminal de fixation au β-dystroglycane, une protéine de fixation à la matrice extracellulaire. La dystrophie musculaire de Duchenne est causée par des délétions, dont la plus fréquente est la délétion des exons 49 et 50, entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré et par conséquent la production d'une protéine non fonctionnelle. L'approche thérapeutique consiste à cibler l'exon 51 avec des oligonucléotides antisens (AON) afin de masquer cet exon et ainsi induire un saut d'exon. La protéine qui en résulte est raccourcie et partiellement fonctionnelle.

Les modifications d'oligonucléotides qui se sont révélées efficaces pour cette approche dans des modèles animaux (modèles transgéniques de souris ou de chiens) sont les PNA (Yin et al. 2008), LNA, 2'-OMe, et PMO. Plusieurs essais cliniques sont aujourd'hui en cours, avec des oligonucléotides 2'-OMe phosphorothioates (PRO-051) et PMO (AVI-4658) injectés en intramusculaire ou en systémique (Akker et al. 2011; Cirak et al. 2011). L'oligonucléotide PRO-051, ou Drisapersen, dont des essais cliniques de phase III ont débuté en décembre 2010, est développé par Prosensa, en partenariat avec GlaxoSmithKline (GSK) (prosensa.eu). L'oligonucléotide AVI-4658, ou Eterplirsén, est développé par Sarepta Therapeutics, avec un essai clinique de phase III prévu début 2014 (duchenneconnect.org). Certaines études sur les modèles de souris ou de chien (Yokota et al. 2009) mettent cependant l'accent sur un problème important : la restauration non suffisante de la dystrophine dans les cellules cardiaques, due à une mauvaise internalisation des oligonucléotides dans ces cellules. Or les patients atteints de DMD meurent généralement de problèmes cardiaques ou respiratoires. Afin d'augmenter l'internalisation des PMO, notamment dans les cellules cardiaques, des conjugués entre les PMO et des peptides pénétrants (CPP), appelés PPMO ont été proposés. Chez la souris mdx (muscular dystrophy X-linked), l'injection systémique d'un PMO conjugué à un peptide positivement chargé et riche en arginines, induit efficacement l'exclusion de l'exon 23 et la restauration de l'expression de la dystrophine dans les muscles, y compris le cœur (Jearawiriyapaisarn et al. 2008).

(d) Epissage alternatif

95% des gènes humains sont régulés *via* un épissage alternatif. L'utilisation d'oligonucléotides antisens bloqueurs stériques pour favoriser ou défavoriser un variant d'épissage par rapport à un autre représente donc potentiellement un intérêt thérapeutique. Cette approche peut avoir un intérêt notamment en cancérologie ; nous citerons ici l'exemple du gène *Bcl-x*, qui comporte deux isoformes : l'isoforme Bcl-xS est pro-apoptotique tandis que l'isoforme Bcl-xL est anti-apoptotique. L'utilisation d'oligonucléotides 2'-OMe phosphorothioates dirigés contre l'ARN pré-messager de *Bcl-x* favorise l'expression du variant Bcl-xS et induit l'apoptose de cellules de cancer du sein et de la prostate (Mercatante et al. 2001).

c) Blocage des miARN

Les miARN sont impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que la différenciation cellulaire, le développement et l'apoptose. La dérégulation de l'expression de miARN a été associée, entre autres, à des problèmes développementaux et de métabolisme, à des infections virales, ainsi qu'à certains cancers. Des centaines de miARN ont été identifiés dans le génome humain et seraient capables de réguler jusqu'à 60% des gènes (Deleavey & Damha 2012). Les oligonucléotides antisens bloqueurs stériques peuvent cibler les miARN et inhiber leurs fonctions en s'y hybridant. Ces oligonucléotides sont appelés antagomirs ou antimirs. Cette stratégie peut permettre à la fois d'élucider la fonction du miARN ciblé, et d'envisager une approche thérapeutique. Les modifications d'oligonucléotides 2'-OMe, 2'-MOE, PNA, LNA et PMO ont été rapportées comme étant efficaces pour bloquer les miARN.

miR-122 est un miARN exprimé dans le foie et impliqué dans plusieurs pathologies, incluant le cancer et l'hépatite C. Il a été montré que l'injection intraveineuse de LNA complémentaires de miR-122 à des chimpanzés infectés par HCV, inhibe la réplication virale (Lanford et al. 2010). Des mixmers LNA/2'-OMe et des PNA (conjugués à un peptide pénétrant) sont également efficaces pour inhiber miR-122 dans des hépatocytes humains et de rat (Fabani & Gait 2008).

miR-155 est un miARN oncogénique dérégulé dans plusieurs cancers humains. Des PNA-lysines dirigés contre ce miARN inhibent ses fonctions dans des cellules B primaires et chez la souris, sans agent de transfection (Fabani et al. 2010).

miR-21 est également un miARN oncogénique, ayant des niveaux d'expression élevés dans certains cancers. Obad et al ont utilisé des LNA 7 et 8 mer pour cibler la région 'seed' (les 6 à 8 nucléotides en 5' du miARN entièrement complémentaires de la cible) de ce miARN (Obad et al. 2011). De plus, ils montrent qu'il est possible d'inhiber des familles entières de miARN avec un même antimir LNA, celles-ci possédant une région seed commune. Ils inhibent ainsi la famille de miARN let-7 (comportant neuf membres).

Actuellement, seul un oligonucléotide mixmer LNA/ADN (miravirsén) est en développement clinique (santaris.com). Cet antimir est dirigé contre miR-122 et est utilisé pour le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C.

I. 3. Conclusion : utilisation et défis de la stratégie antisens

Les oligonucléotides antisens bloqueurs stériques agissent donc selon un mécanisme non catalytique, à la différence des oligonucléotides recrutant la RNase H et des siARN. Ces derniers sont actifs à des concentrations généralement inférieures à 100 nM, l'acide nucléique actif pouvant être recyclé afin d'initier d'autres étapes de clivage de l'ARN cible, par la RNase H ou AGO2. Dans le cas d'un blocage stérique, les concentrations effectives en oligonucléotides sont plus importantes (de l'ordre du micromolaire), ce mécanisme nécessitant une quantité stoechiométrique de molécules actives sur l'ARN cible.

A la différence des oligonucléotides antisens, les siARN sont des ARN double-brins induisant le clivage du transcrite cible par AGO2. Les modifications chimiques développées pour les oligonucléotides antisens et l'expérience clinique acquise dans le domaine des antisens ont accéléré et facilité le développement des siARN. Les optimisations récentes dans la conception et la chimie des siARN, en font aujourd'hui les outils les plus utilisés en culture cellulaire, avec des efficacités souvent supérieures à celles des oligonucléotides antisens recrutant la RNase H. Ceci s'explique probablement par l'assistance du complexe RISC pour la fixation du brin antisens du siARN sur la séquence cible, plutôt que par une activité catalytique supérieure d'AGO2 vis-à-vis de la RNase H (Bennett & Swayze 2010). Cependant, la nature double-brin des ARN interférents représente potentiellement un inconvénient en terme de coûts de production. De manière intéressante, il a été montré que le brin passager, pouvant potentiellement provoquer des effets 'off-target' indésirables, n'est pas nécessaire pour l'inhibition par ARN interférence. En effet, des siARN simple-brins, appelés ss-siRNA (single-stranded siRNAs), constitués uniquement du brin guide comportant des modifications chimiques (PS, 2'-F et 2'-OMe) et une extrémité 5' phosphate, sont suffisants pour interagir avec le RISC et peuvent être efficaces *in vivo*, avec une bonne stabilité métabolique (Lima et al. 2012). Une optimisation plus fine de ces ss-siARN permettrait d'augmenter le potentiel de ces molécules, qui constitueraient une stratégie alternative pour l'inhibition post-transcriptionnelle de l'expression des gènes.

Aujourd'hui, la principale limite pour l'utilisation thérapeutique des oligonucléotides antisens et des siRNA demeure leurs faibles internalisation cellulaire et biodisponibilité. Ceci est probablement la raison principale expliquant que, malgré le nombre important d'agents antisens en essais cliniques, peu sont actuellement enregistrés sur le marché.

Chapitre II : Internalisation cellulaire des acides nucléiques

Pour être actif, un acide nucléique doit se trouver, au bon moment, dans les cellules et le compartiment subcellulaire où se trouve sa cible. Dans le cas des siARN et des oligonucléotides dirigés contre un ARNm ou un miARN, l'enjeu est donc d'atteindre le cytoplasme, tandis que pour un oligonucléotide agissant sur l'épissage et ciblant les ARN pré-messagers, le compartiment à atteindre est le noyau. Les problèmes de vectorisation et d'internalisation cellulaires sont communs à tous les acides nucléiques et le développement de stratégies efficaces est un enjeu majeur pour la réussite des applications cliniques d'un grand nombre de molécules prometteuses. Les propriétés pharmaco-dynamiques de chaque type d'acides nucléiques sont différentes, mais il existe un certain nombre de barrières biologiques communes, entre l'administration dans l'organisme et leur action finale dans les cellules, que ceux-ci doivent franchir pour exercer leur activité. Ces différentes barrières, à l'échelle de l'organisme et de la cellule, seront présentées dans cette partie, ainsi que les stratégies non virales existantes pour augmenter l'internalisation cellulaire des acides nucléiques.

II. 1. Nécessité de la vectorisation

1.1. Des premiers essais à la recherche de transporteurs pour les acides nucléiques

Certaines études et essais cliniques rapportent l'activité d'oligonucléotides nus, non vectorisés. En particulier, l'internalisation, en l'absence d'agent de transfection ou de transporteur, d'oligonucléotides modifiés tels que des gapmers LNA dans différentes lignées cellulaires humaines et chez la souris a été qualifiée de '*gymnotic delivery*' (Zhang et al. 2011; Stein et al. 2010). Selon les auteurs, cette technique prend simplement avantage des propriétés de croissance des cellules en culture pour aboutir à une internalisation cellulaire la plus efficace possible. Toutefois, il est à noter que les activités biologiques sont observées à de fortes concentrations en LNA gapmers, de l'ordre du micromolaire.

Cependant, de nombreuses études rapportent des problèmes de manque d'activité biologique des siARN et oligonucléotides nus, résultants d'une mauvaise internalisation cellulaire et les condamnant à une faible valeur thérapeutique (Stein et al. 2008). Une internalisation cellulaire assistée par un transporteur est donc nécessaire pour délivrer les acides nucléiques dans le cytoplasme ou le noyau dans le cadre d'une application systémique.

1.2. Les barrières biologiques extracellulaires

La première barrière à laquelle sont confrontés les acides nucléiques après leur injection est l'activité nucléolytique dans le plasma et les tissus. La partie la plus sensible à la dégradation est l'extrémité 3', l'activité 3' exonucléase étant la principale. L'introduction des différentes modifications chimiques présentées dans la première partie est donc nécessaire pour augmenter la durée de vie des acides nucléiques dans les milieux biologiques.

Après leur injection, les différents oligonucléotides et siARN sont distribués dans les différents tissus, à l'exception du système nerveux central, et ont pour point commun leur accumulation dans les reins, suivie de leur élimination rapide dans les urines (clairance rénale) (Juliano et al. 2009). La conjugaison des oligonucléotides ou siARN à des molécules lipidiques telles que le cholestérol, augmente leur fixation aux lipoprotéines du sérum et/ou à l'albumine, conduisant à une augmentation de la durée de vie dans la circulation sanguine (Soutschek et al. 2004). Par ailleurs, une augmentation de l'internalisation dans les hépatocytes est aussi observée, résultant de l'interaction entre le cholestérol et les récepteurs aux LDL (Low-Density Lipoprotein).

Une autre voie d'élimination des acides nucléiques est la clairance par le système réticuloendothélial, dont les organes principaux sont le foie et la rate. Les acides nucléiques, nus ou conjugués à des transporteurs tels que les nanoparticules, sont détectés et éliminés par les cellules phagocytaires du système réticuloendothélial, qui sont des monocytes circulants, les cellules de Kupffer dans le foie et les macrophages spléniques. Une stratégie permettant de diminuer la reconnaissance des nanoparticules par ce système réticuloendothélial, consiste à utiliser des polymères inertes comme le PEG (Polyéthylène Glycol) pour masquer les nanoparticules et réduire leur opsonisation par des protéines sériques, qui est l'étape initiant la reconnaissance par les phagocytes. Ainsi, l'accumulation des oligonucléotides et siARN dans le foie et la rate est potentiellement diminuée, et le temps de vie dans la circulation sanguine augmenté, leur offrant plus de temps pour gagner le tissu cible (Li & Huang 2010).

L'endothélium vasculaire représente également une barrière à franchir entre la circulation générale et le tissu cible. La perméabilité de cet endothélium repose sur la présence de deux types de pores : des petits pores d'environ 45 ångström de diamètre, résultant des imperfections de jonctions entre les cellules endothéliales (voie paracellulaire), et des pores d'environ 250 ångström de diamètre dont l'identité est controversée (Juliano et al. 2009). Selon leur poids moléculaire, les oligonucléotides et siARN devraient pouvoir traverser l'endothélium vasculaire *via* les petits pores. Cependant, la forme et la charge de la molécule sont des facteurs pouvant ralentir ce passage du sang vers le tissu (Juliano et al. 2009; Juliano et al. 2008). Certains tissus spécialisés comme le foie et la rate, comportent un endothélium vasculaire dit 'fenêtré', permettant le passage de molécules jusqu'à 200 nm de diamètre entre les cellules endothéliales. Ceci facilite d'autant plus l'accumulation des acides nucléiques dans ces organes. Il est à noter que la perméabilité de l'endothélium vasculaire dans les tumeurs est généralement beaucoup plus importante que celle dans les tissus normaux, avec des pores allant de 100 à 700 nm (Juliano et al. 2009). Ceci, associé à un faible drainage lymphatique au sein des tumeurs, résulte en une accumulation sélective des macromolécules ou nanotransporteurs dans le tissu tumoral. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention).

Avant d'atteindre les cellules cibles, les acides nucléiques doivent encore diffuser à travers la matrice extracellulaire, constituée d'un dense réseau de protéines et de protéoglycanes avec lesquelles ils peuvent éventuellement interagir (Juliano et al. 2008).

1.3. Internalisation cellulaire

a) Mécanismes d'internalisation cellulaire

L'étape suivante consiste en l'entrée dans la cellule cible et au franchissement de la barrière que constitue la membrane plasmique. Les petites molécules essentielles telles que les acides aminés, les sucres et les ions, peuvent traverser la membrane plasmique *via* des transporteurs, des pompes protéiques ou des pores. Les macromolécules et solutés sont quant à eux internalisés par un mécanisme d'invagination de la membrane, suivi de la formation de vésicules intracellulaires, appelé endocytose. Ce processus énergie dépendant se subdivise en deux catégories : la phagocytose et la pinocytose.

La phagocytose concerne l'internalisation de grosses particules et est un processus spécifique à certains types cellulaires (macrophages, monocytes, neutrophiles). La pinocytose est l'endocytose des fluides et solutés et se compose de quatre voies : la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la clathrine, la voie cavéolaire et l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline (Figure 12). Ces voies, non mutuellement exclusives, diffèrent de par les mécanismes de formation des vésicules et les protéines impliquées dans ces mécanismes, ainsi que par la taille de ces vésicules (Conner & Schmid 2003). La macropinocytose est une voie impliquant la formation de grosses vésicules endosomales appelées macropinosomes, de forme et de taille hétérogènes. Elle est initiée suite à une évagination de la membrane plasmique permettant d'internaliser de larges volumes de milieux extracellulaire et donc de grandes quantités de solutés. Cette voie est induite par des facteurs de croissance. Les autres voies sont généralement initiées par l'interaction de la molécule avec un récepteur cellulaire protéique ou lipidique (Juliano et al. 2009). Le choix de l'une ou l'autre de ces voies dépend de la nature et de la taille de la molécule à internaliser et du récepteur impliqué, mais peut également dépendre du type cellulaire ou de l'état physiologique de la cellule (Veldhoen et al. 2008).

Une fois formé, le complexe ligand-récepteur est ensuite internalisé dans une vésicule qui bourgeonne de la face cytosolique de la membrane et qui est détachée par l'étranglement du col de la vésicule, le plus souvent par la GTPase dynamine. La vésicule ainsi formée transite ensuite séquentiellement dans différents compartiments endomembranaires de pH de plus en plus faible. Le premier compartiment vers lequel convergent les vésicules inhérentes à chaque voie est l'endosome précoce. Puis, des événements de fusion entre vésicules, orchestrés par les protéines SNARE (soluble N-methylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors), conduisent les molécules internalisées dans des endosomes tardifs (pH compris entre 5 et 6) ou les lysosomes (pH compris entre 3,5 et 5), ou vers le réseau trans-golgien. Alternativement, le récepteur et le ligand peuvent être dissociés dans l'environnement légèrement acide de l'endosome précoce et le récepteur peut être recyclé à la membrane *via* un endosome de recyclage (Juliano et al. 2011). Le routage de ces vésicules et le choix des compartiments de transit sont régulés par la famille de GTPases Rab, et par des protéines qui connectent les membranes entre elles (*tethering proteins*). Ce routage est également une étape limitante et importante de l'internalisation des acides nucléiques puisque certaines voies, comme la voie sécrétoire ou la voie lysosomale sont à éviter, conduisant respectivement à l'export et à la dégradation de la molécule (Juliano et al. 2009). Certaines études ont montré qu'il est possible d'interférer avec ces voies de routage. Par exemple,

l'inhibition de la protéine kinase A dans des cellules HeLa augmente l'efficacité de transfection de polymères branchés de polyéthylèneimine (PEI) complexés à des oligonucléotides, en évitant leur routage vers les endosomes tardifs et les lysosomes (ur Rehman et al. 2011). Une stratégie consiste également à coupler des ligands spécifiques aux acides nucléiques pour reconnaître un récepteur particulier et induire l'internalisation *via* la voie d'endocytose associée à ce récepteur. La transferrine est une protéine impliquée dans le métabolisme du fer. La voie d'endocytose empruntée par le complexe formé entre la transferrine et son récepteur a été caractérisée comme étant la voie dépendante de la clathrine. Il a été montré que le couplage de la transferrine à un polycation permet l'internalisation efficace du complexe formé avec de l'ADN plasmidique dans des cellules de poulet (Wagner et al. 1990). La spécificité de cette approche a été plus tard contestée, dans le cadre de l'utilisation de lipoplexes (complexes entre des liposomes cationiques de l'ADN plasmidique) associés à la transferrine pour augmenter leur internalisation. Ces complexes seraient internalisés par une voie d'endocytose indépendante du récepteur à la transferrine (Simões et al. 1999).

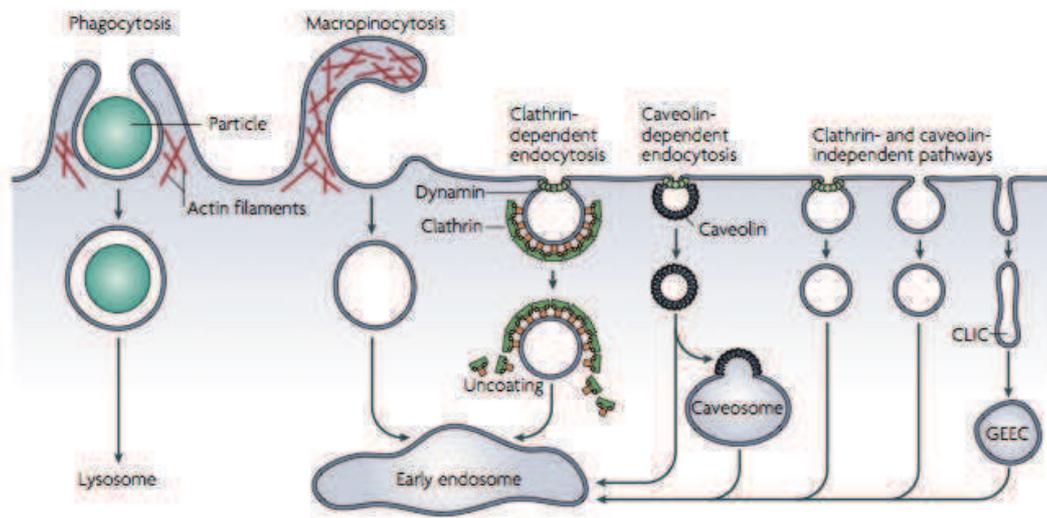


Figure 12 : Voies d'endocytose (d'après Mayor et Pagano 2007).

Il existe cinq mécanismes d'endocytose décrits, qui diffèrent par la taille des vésicules, la nature du composé à internaliser et les protéines impliquées dans la formation des vésicules. La phagocytose et la macropinocytose impliquent de gros remodelages de la membrane plasmique qui font intervenir un réseau de filaments d'actine. Les vésicules formées par la voie dépendante de la clathrine sont tapissées de clathrine. Ce manteau de clathrine est ensuite dépolymérisé, et la vésicule fusionne avec un endosome précoce ('early endosome'). La voie dépendante de la cavéoline est initiée au niveau de microdomaines membranaires hydrophobes, riches en cholestérol et glycosphingolipides. L'existence du caveosome comme compartiment intermédiaire des vésicules tapissées de cavéoline est aujourd'hui controversée (Parton & Howes 2010). Il existe plusieurs voies indépendantes de la clathrine et de la cavéoline, et dépendantes ou non de la dynamine. Ces voies peuvent impliquer des intermédiaires tubulaires dérivés de la membrane plasmique appelés CLIC (Clathrin- and Dynamine- Independent Carriers) ou les GEEC (Glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein Enriched early Endosomal Compartments).

b) Stratégies d'échappement endosomal

L'ultime barrière pour l'acheminement des acides nucléiques dans le compartiment cible (généralement le noyau ou le cytoplasme) est l'échappement aux endosomes avant le transit dans les lysosomes (Abes, Williams, et al. 2006). Différentes stratégies ont été développées pour faciliter ou provoquer la libération du matériel endocytosé.

Certains vecteurs cationiques comme la PEI ou des peptides cationiques riches en histidines, possèdent un fort pouvoir tampon dans une gamme de pH comprise entre 5 et 7,2. Ils induisent donc un import de protons dans l'endosome, suivi d'une entrée d'ions chlorure et d'eau, conduisant à une augmentation de la pression osmotique et à la rupture de la membrane endosomale, libérant alors le contenu endosomal dans le cytosol (Figure 13B). Ce processus est appelé l'effet 'éponge à protons' (Boussif et al. 1995). En accord avec ce mécanisme, la dissociation du complexe entre le polymère de PEI et l'acide nucléique aurait lieu dans le cytoplasme, par échanges avec des composants cellulaires négativement chargés et le polymère (ur Rehman et al. 2013). Cependant, cet effet 'éponge à protons' est controversé par certaines études récentes. Une étude montre que la membrane lysosomale n'est pas complètement lysée lors de la libération du complexe PEI-acide nucléique et que ces complexes ne sont pas libérés intacts dans le cytosol, observant plutôt une fuite de l'acide nucléique tandis qu'au moins une partie du polymère de PEI reste dans la vésicule (ur Rehman et al. 2013). De plus, le pH lysosomal n'est pas augmenté dans les vésicules contenant du PEI (Benjaminsen et al. 2013). Ces études suggèrent la possibilité d'un mécanisme plus fin, impliquant une déstabilisation partielle de la membrane endosomale ou la formation de pores, conduisant à une libération locale et directionnelle dans le cytosol.

Dans les études cellulaires, des agents lysosomotropiques sont couramment utilisés en co-traitement avec les oligonucléotides ou acides nucléiques. Les plus utilisés sont le calcium, le sucrose et la chloroquine. La chloroquine est une base faible qui s'accumule dans les vésicules acides et dont les fonctions amines peuvent être protonnées à pH faible. Cette accumulation conduit à un influx d'ions chlorure et d'eau et à la déstabilisation de la membrane des endosomes et lysosomes. De plus, la chloroquine inhibe l'acidification et la maturation des endosomes, ce qui permet de retarder la fusion avec les lysosomes (Khalil et al. 2006).

Une stratégie photochimique appelée Photochemical Internalization (PCI) est couramment utilisée pour provoquer la libération du matériel contenu dans les endosomes (voir page 64).

Certains lipides ou peptides, dits fusogènes, sont sensibles au pH, et subissent un changement structural en milieu acide, qui leur permet de fusionner avec la membrane de l'endosome, ou de la déstabiliser. Le lipide neutre DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine) forme une bicouche stable à pH physiologique et subit une transition de phase pour former une bicouche en structure hexagonale inversée, qui fusionne avec la membrane de l'endosome (Figure 13A) (Wrobel & Collins 1995; Farhood et al. 1995).

De même, certains peptides, synthétiques ou issus de virus ayant développé des mécanismes d'échappement aux endosomes, sont capables de perturber la membrane endosomale à pH faible. Notamment, un peptide de 20 acides aminés, issu de la séquence N-terminale de la sous-unité HA-2 de l'hémagglutinine du virus influenza (grippe), est utilisé pour assister l'internalisation de différentes molécules et provoquer leur libération dans le cytoplasme. Une étude montre que l'activité biologique de la recombinase Cre, couplée au CPP Tat, est stimulée dans le cas d'un cotraitement des cellules avec un conjugué Tat-HA2 (Wadia et al. 2004). L'avantage de cette stratégie repose sur l'internalisation des deux conjugués dans les mêmes vésicules d'endocytose (macropinosomes dans ce cas) et la déstabilisation uniquement des vésicules contenant la molécule à internaliser (Figure 14), générant une toxicité moindre à celle d'un mécanisme non ciblé de déstabilisation. Le peptide synthétique GALA est un peptide synthétique de 30 acides aminés, sensible au pH, capable de stimuler la libération cytoplasmique de certains composés par un mécanisme similaire (Simões et al. 1999; Khalil et al. 2006; Hatakeyama et al. 2009).

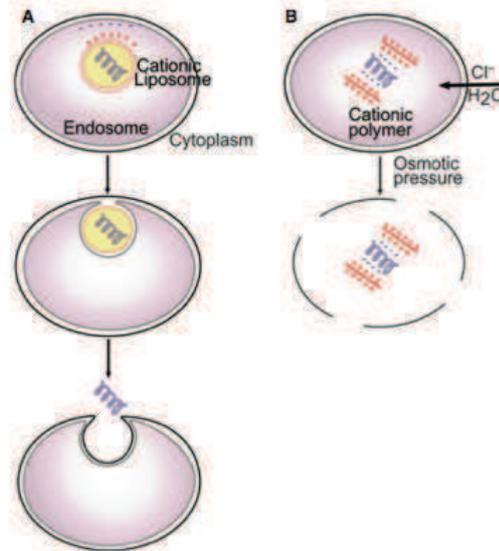


Figure 13 : Mécanismes d'échappement endosomal (d'après Gooding et al. 2012).

(A) : La fusion de la membrane liposomale et de la membrane de l'endosome est facilitée par la présence de co-lipides fusogènes neutres tels que le DOPE dans le liposome cationique. (B) Les polymères ou peptides cationiques fortement chargés, tels que le PEI, se protonnent dans l'endosome, provoquant un influx d'ions chlorures et d'eau, provoquant la rupture de la membrane endosomale. Ces deux mécanismes aboutissent à la libération du contenu de l'endosome dans le cytosol.

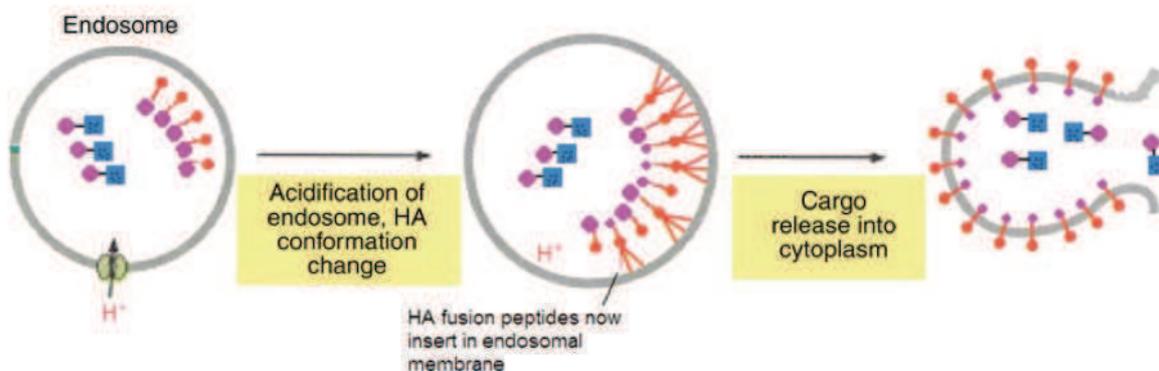


Figure 14 : Mécanisme proposé pour la libération de Tat-Cre dans le cytoplasme, assistée par un co-traitement avec un conjugué Tat-HA2 (d'après Sebbage 2009).

Le co-traitement des cellules avec les conjugués Tat-Cre et Tat-HA2 résulte en la présence des deux types de conjugués dans les mêmes vésicules d'endocytose. Le faible pH endosomal provoque un changement conformationnel de HA2, lui conférant la propriété de déstabilisation des endosomes et induisant la libération de Tat-Cre dans le cytoplasme. bleu : protéine Cre (cargo), violet : CPP Tat, orange : HA2, gris : membrane de l'endosome.

Certains mécanismes de translocation énergie-indépendants ont été proposés pour l'internalisation de certaines molécules, dont les CPP (voir page 78), permettant ainsi d'éviter la voie endosomo-lysosomale.

De plus, il est intéressant de noter que la cible peut se trouver dans le même compartiment cellulaire que l'acide nucléique endocytosé. Par exemple, une étude avec un PNA antimicro dirigé contre le miARN miR-122, montre que le PNA est internalisé par endocytose et que le ciblage du micro ARN a lieu dans des compartiments endosomaux où les deux molécules colocalisent, sans nécessité de libération du PNA dans le cytosol (Torres et al. 2011).

c) Le noyau : une barrière supplémentaire ?

L'entrée des oligonucléotides dans le noyau à partir du cytosol ne constitue *a priori* pas une barrière, ce processus étant régulé par les pores nucléaires qui permettent le transport passif de molécules jusqu'à 70 kDa et 10 nm de diamètre (Melchior & Gerace 1995). Cependant, il faut souligner que le couplage de l'oligonucléotide à un transporteur augmente sa taille, ce qui constitue potentiellement une limitation pour l'import nucléaire. Eventuellement, des peptides NLS (signal de localisation nucléaire), peuvent être utilisés pour induire le ciblage nucléaire *via* un import actif par des pores nucléaires ayant une ouverture jusqu'à 30 nm de diamètre.

Une endocytose efficace des acides nucléiques implique donc trois étapes à optimiser : l'internalisation, le routage vésiculaire et la libération des endosomes.

II. 2. Stratégies non virales d'internalisation des acides nucléiques

Des stratégies virales ont été employées avec succès comme systèmes de délivrance de gènes thérapeutiques, avec différentes catégories de virus : les rétrovirus, les adénovirus et les virus adéno-associés (AAV) (Zhang & Godbey 2006). Les rétrovirus ne sont transduits que dans les cellules en prolifération et intègrent aléatoirement leur information génétique dans le génome de la cellule hôte. Les adénovirus peuvent être transduits à la fois dans les cellules en prolifération et dans les cellules quiescentes et n'intègrent pas leur matériel génétique dans le

génomique de la cellule hôte. Leur matériel génétique reste sous forme épisomale et est faiblement et transitoirement exprimé. Les AAV peuvent transduire des cellules quiescentes et prolifératives et l'insertion de leur ADN est possible dans le génome de la cellule hôte, permettant l'expression à long terme du transgène. Malgré la bonne efficacité de transduction de ces vecteurs viraux, leur utilisation en thérapie est encore mal contrôlée et le risque de mutagenèse par insertion dans le génome dû à des éléments viraux résiduels est important. De plus, des problèmes immunologiques sont fréquemment rencontrés avec ces vecteurs. L'utilisation de vecteurs non viraux est donc généralement privilégiée. Nous nous consacrerons donc dans ce paragraphe à la description des systèmes non viraux.

2.1. Méthodes physiques

Il est possible de délivrer les acides nucléiques directement dans le cytoplasme ou le noyau des cellules (évitant ainsi la capture dans les endosomes et lysosomes) par des techniques provoquant une altération transitoire de la membrane plasmique.

La microinjection consiste à injecter directement l'acide nucléique dans le cytosol ou le noyau à l'aide d'un micro capillaire en verre. Il a ainsi été montré que les oligonucléotides PO et PS peuvent diffuser dans le noyau en quelques secondes après leur injection dans le cytoplasme (Leonetti et al. 1991). Cette technique était utilisée pour les premières études cellulaires des PNA (Hanvey et al. 1992) et est aujourd'hui très utilisée dans des embryons d'organismes modèles comme le poisson zèbre, pour les études fonctionnelles de gènes au cours du développement (injection au stade une cellule). Cette technique laborieuse et peu reproductible n'est cependant pas transposable en thérapie.

L'électroporation consiste en l'application de courtes impulsions électriques de haut voltage sur les cellules, afin de provoquer une déstabilisation transitoire et réversible de la membrane plasmique. Après cette perméabilisation transitoire, les petites molécules sont capables de pénétrer et de diffuser dans la cellule, indépendamment de leur charge. Pour les plus grosses molécules telles que l'ADN, le champ électrique représente un rôle important, étant responsable de la migration de la molécule vers l'électrode positive et dans la cellule. La charge de la molécule est alors un paramètre important qui influence l'efficacité et le mécanisme d'internalisation (Gehl 2003). N'importe quelle molécule peut donc théoriquement être introduite dans la cellule par cette technique, et des résultats positifs ont

été obtenus pour une variété de molécules, telles que des oligonucléotides, de l'ADN, des siARN ou des protéines. La formation des pores membranaires (en une durée de l'ordre de la microseconde) est suivie d'un processus de refermeture de ces pores, impliquant le cytosquelette et d'une durée de quelques minutes (Gehl 2003). Une optimisation des paramètres électriques (durée et intensité du champ électrique) peut permettre une électroporation de certaines molécules avec une grande efficacité et une viabilité cellulaire raisonnable. L'électroporation est également efficace pour les oligonucléotides neutres tels que les PNA (Shammas et al. 1999; Joergensen et al. 2011), impliquant uniquement la diffusion de ces molécules après perméabilisation de la membrane. L'introduction de charges positives (par ajout d'acides aminés positivement chargés) ou négatives (PNA phosphonates) a un impact sur l'efficacité d'internalisation par électroporation, le PNA avec des charges négatives étant étonnamment le moins efficacement internalisé (Joergensen et al. 2011). Cette technique a également montré une efficacité *in vivo*, chez différentes espèces, dans le foie, le cerveau, les muscles et la peau, notamment avec l'utilisation d'électrodes à aiguilles. La première utilisation en clinique de l'électroporation a été décrite en 2003 (Belehradek et al. 1993), pour un traitement combiné de tumeurs du cou et de la tête par injection intraveineuse de bléomycine, suivie de plusieurs impulsions électriques courtes (100 µsecondes) et intenses (1300 V/cm).

Une perméabilisation transitoire et réversible peut également être générée par des toxines bactériennes telles que la streptolysine-O (SLO). La SLO est une exotoxine produite par certaines bactéries gram-positives, capable de se lier sous une forme monomérique au cholestérol des membranes des cellules animales, et de s'oligomériser (de 50 à 80 sous-unités) en formant des pores d'environ 30 nm de diamètre (Palmer et al. 1998). Le désassemblage et la fermeture de ces pores est réalisée en quelques dizaines de secondes par ajout de cations divalents (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) (Idone et al. 2008) et permet de contrôler la fin du processus de perméabilisation sans entraver la viabilité cellulaire. Cette technique de transfection a été utilisée pour délivrer des oligonucléotides antisens (Boutimah-Hamoudi et al. 2007; Faria et al. 2001) ou des siARN (Brito et al. 2008) dans diverses lignées cellulaires. En dépit de la possibilité de traiter les cellules *ex vivo*, cette technique n'est pas transposable *in vivo*.

Malgré la grande efficacité de ces approches due notamment à l'absence de séquestration endosomale, leur caractère fortement invasif implique souvent une mortalité cellulaire importante. De plus, ces techniques sont difficilement transposables chez le patient.

2.2. Méthodes photochimiques

La PCI (Photochemical Internalization) est une stratégie d'internalisation assistée par la lumière, utilisant des photosensibilisateurs pour provoquer la libération de molécules des endosomes ou lysosomes vers le cytoplasme (Lam 2012). Les photosensibilisateurs les plus efficaces utilisés en PCI sont des molécules amphiphiles qui se lient à la membrane plasmique et sont internalisées par endocytose, conduisant à leur localisation dans le feuillet interne de la membrane endosomale. Ils restent alors inactifs jusqu'à leur exposition à une longueur d'onde spécifique, induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), principalement l'oxygène singulet (1O_2). L'oxygène singulet initie des réactions chimiques conduisant à la rupture de la vésicule d'endocytose et à la libération de son contenu dans le cytoplasme (Figure 15). Cette technologie est donc potentiellement une solution pour la libération d'une molécule d'intérêt (protéine, acide nucléique, polymère synthétique...) internalisée en même temps qu'un composé photosensible efficace.

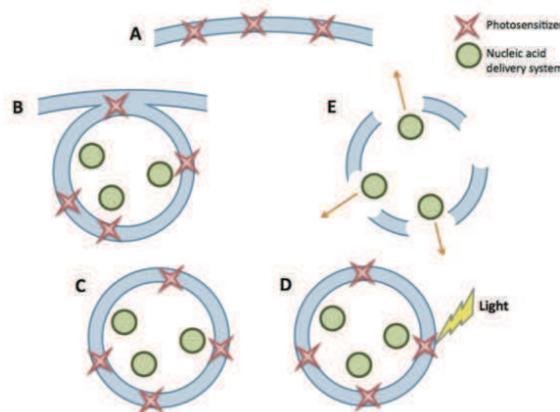


Figure 15 : Principe de la Photochemical Internalization (PCI) (d'après Liang et Lam 2012).

(A) Le photosensibilisateur (en rose) se fixe dans la membrane plasmique (B) Ceci est suivi de son internalisation par endocytose, de manière concomitante à l'internalisation d'une molécule d'intérêt (en vert) (C) Les photosensibilisateurs, inactifs, sont présents au sein de la vésicule d'endosome contenant la molécule d'intérêt (D) Sous l'effet de l'irradiation, le photosensibilisateur est activé (E) La production d'espèces réactives de l'oxygène et notamment de 1O_2 résultant de l'activation du photosensibilisateur, entraîne la rupture de la membrane endosomale et la libération de la molécule d'intérêt dans le cytosol.

Les photosensibilisateurs les plus utilisés pour la PCI sont la tétraphénylporphrine disulfonate (TPPS_{2a}) et la phthalocyanine d'aluminium disulfonate (AlPcS_{2a}) (Figure 16) et leurs longueurs d'ondes d'absorption maximales sont de 415 nm et 675 nm, respectivement. L'activation d'un photosensibilisateur sous l'effet de l'irradiation se fait par le passage d'un

état fondamental d'énergie à un état excité, par absorption de l'énergie d'un photon d'une certaine longueur d'onde. Le photosensibilisateur dans son état excité peut alors transférer l'énergie absorbée à d'autres molécules, et notamment à l'oxygène, aboutissant à la formation d'oxygène singulet, un puissant agent oxydant. L'oxygène singulet possédant un faible rayon d'action (10-20 nm) et un temps de vie très court (moins de 0,1 ms), ne peut provoquer des dommages qu'aux structures cellulaires proches telles que la membrane endosomale à proximité de laquelle il est produit.

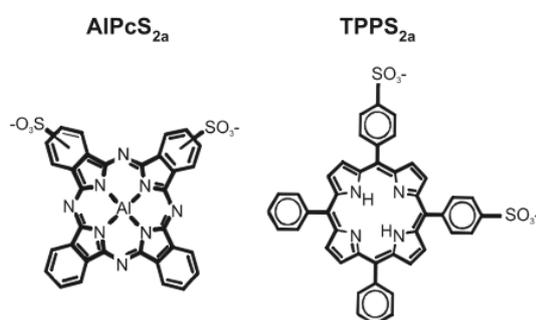


Figure 16 : Structures chimiques des photosensibilisateurs tétraphénylporphyrine disulfonate (TPPS_{2a}) et phthalocyanine d'aluminium disulfonate (AIPcS_{2a})(d'après Hogset et al. 2004).

La PCI a été utilisée dans quelques études pour augmenter l'efficacité des acides nucléiques, en permettant d'utiliser des concentrations plus faibles pour atteindre une même activité biologique. Par exemple, 2 μ M d'un PNA antisens dirigé contre la sous-unité catalytique de la télomérase humaine, inhibent fortement l'activité télomérase dans des cellules de cancer de la prostate, après coincubation avec TPPS_{2a} et irradiation (Folini et al. 2003). Egalement, un siARN dirigé contre le récepteur à l'EGFR (Epidermal Growth Factor), complexé à la lipofectamine, fait preuve d'une efficacité cellulaire dix fois supérieure en combinant le traitement avec une PCI induite par TPPS_{2a} (Oliveira et al. 2007). De plus faibles doses de siARN peuvent ainsi être efficacement employées, permettant de réduire potentiellement la saturation de la machinerie ARNi et les effets 'off-target'. Une étude par Shiraishi et Nielsen, montre que la PCI avec le photosensibilisateur AIPcS_{2a} augmente jusqu'à un facteur 100 l'activité antisens d'un PNA antisens conjugué à différents CPP (Shiraishi & Nielsen 2006b).

La PCI s'est révélée être une stratégie efficace pour augmenter l'efficacité d'internalisation d'une grande variété de molécules dans un grand nombre de lignées cellulaires et de modèles animaux (Selbo et al. 2010). Un essai clinique de phase II, développé par PCI Biotech AS, évalue l'efficacité et la toxicité du photosensibilisateur Amphinex (TPCS_{2a}) dans le cadre d'une thérapie PCI avec l'agent cytotoxique bléomycine dans des carcinomes de la tête et du cou (www.pcibiotech.no). La spécificité d'action au site irradié fait de la PCI une technologie potentiellement peu toxique pour une application systémique. Cependant, une restriction *in vivo* est apportée par la pénétration limitée de la lumière dans les tissus, la profondeur de pénétration maximale de la lumière infrarouge étant considérée être 2 cm (Selbo et al. 2010). Toutefois, le développement de nouveaux lasers et fibres optiques pouvant être utilisés en endoscopies, permettraient de pouvoir illuminer des régions du corps humain précédemment inaccessibles, telles que le tractus gastro-intestinal, les poumons ou les organes uro-génitaux (Høgset 2004).

La distance entre le photosensibilisateur et la molécule d'intérêt peut être également importante, les espèces réactives de l'oxygène formées pouvant inactiver ou créer des mutations sur l'agent thérapeutique par un processus d'oxydation (Norum et al. 2009). L'importance de ces dommages varie certainement avec la nature de la molécule thérapeutique et du photosensibilisateur utilisé.

2.3. Méthodes chimiques

a) Nanotransporteurs

i) Lipoplexes et polyplexes

L'utilisation de ces nanotransporteurs pour l'internalisation des acides nucléiques repose principalement sur la formation de complexes formés par des interactions électrostatiques entre l'acide nucléique négativement chargé et des lipides ou polymères cationiques. Cette stratégie est très utilisée pour l'internalisation d'ADN double-brins ou de siARN, mais n'est, *a priori*, pas applicable pour des oligonucléotides neutres tels que les PNA ou les PMO.

Les lipides cationiques sont composés d'une tête polaire cationique et d'une région hydrophobe consistant en une ou deux chaînes alkyles ou en un stéroïde comme le cholestérol. Ils sont principalement utilisés sous forme de liposomes cationiques, dans lesquels les lipides sont organisés en bicouche(s) vésiculaire(s), entourant un compartiment aqueux. Certains liposomes cationiques ne peuvent se former seuls et des lipides neutres leurs sont ajoutés, comme le dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) ou le cholestérol. Les complexes formés entre des liposomes cationiques et des acides nucléiques chargés négativement sont appelés lipoplexes. Les acides nucléiques peuvent être positionnés dans le centre aqueux, entre les couches lipidiques ou à la surface du liposome. En absence d'acides nucléiques, la taille des liposomes est typiquement d'une centaine de nm, et passe de 200 nm à 2 µm lorsque l'ADN est complexé (Khalil et al. 2006). L'encapsulation de l'acide nucléique dans le liposome lui confère un avantage en terme de stabilité vis-à-vis des nucléases extra et intracellulaires.

L'internalisation d'acides nucléiques avec des lipides cationiques (lipofection) a été réalisée pour la première fois en 1987 dans des cellules en culture (Felgner et al. 1987), avec le lipide DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride) et de l'ADN plasmidique. Depuis, de nombreux lipides sont utilisés et certains sont commercialisés, comme la lipofectamine® (Life TechnologiesTM), constituée d'un mélange 3:1 du lipide polycationique DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate) et du lipide neutre DOPE. Une lipofectamine optimisée, la lipofectamine® 2000, permet de délivrer avec une grande efficacité aussi bien de l'ADN que des siARN, dans une grande variété de cellules.

Les inconvénients de ces composés sont une toxicité cellulaire relativement importante, l'induction d'une réponse inflammatoire *in vivo*, ainsi que des effets non spécifiques sur l'expression des gènes (Gooding et al. 2012). Une étude de transcriptome (Omidi et al. 2003) évaluant les effets de la lipofectamine et de l'oligofectamine dans des cellules épithéliales humaines montre qu'une altération de l'expression de jusqu'à 16% des transcrits considérés est induite par ces lipides cationiques. Les gènes affectés sont impliqués notamment dans la prolifération et la différenciation cellulaire et dans l'apoptose et une augmentation de l'apoptose a été observée dans les cellules traitées avec les lipides cationiques. Les résultats obtenus après lipofection d'oligonucléotides antisens ou de siARN sont donc à interpréter avec prudence, les modulations de l'expression génique pouvant exalter, inhiber ou masquer l'effet spécifique recherché. De nouvelles formulations de la

lipofectamine ont été développées et commercialisées (Life TechnologiesTM), telles que la lipofectamine[®] LTX ou la lipofectamine[®] RNAiMAX, plus efficaces et moins toxiques.

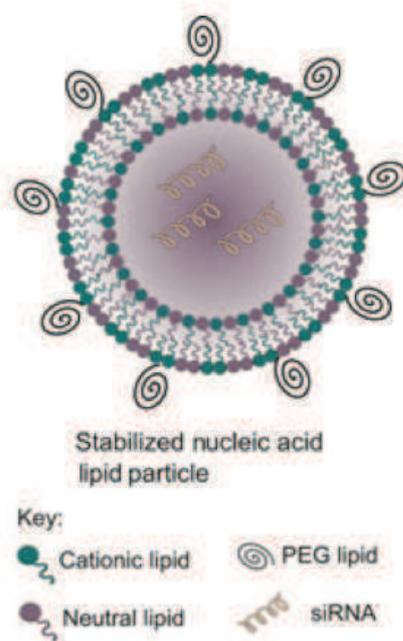


Figure 17 : Composition et structure d'un liposome de type SNALP (Stabilized Nucleic Acid Lipid Particle) (d'après Gooding et al. 2012).

Les liposomes de type SNALP (Stable Nucleic Acid Lipid Particle) contiennent un mélange de lipides cationiques et fusogènes et sont stabilisés par la présence de PEG en surface (Figure 17). Des SNALP se sont révélés être efficaces pour transporter des siARN après injection chez différentes espèces animales. Notamment, des SNALP encapsulant un siARN dirigé contre l'apolipoprotéine B-100, ont permis d'obtenir une inhibition spécifique de 90% de l'ARNm dans le foie de singes, deux jours après injection systémique de 2,5 mg/kg (Zimmermann et al. 2006).

Les complexes formés entre les acides nucléiques et les polymères cationiques sont appelés polyplexes. Les particules ainsi formées sont généralement plus petites que celles formées avec les liposomes, avec une taille dépendante de la nature du polymère utilisé et du ratio entre ce polymère et l'acide nucléique (Khalil et al. 2006). Les polymères cationiques les plus couramment employés sont la poly-L-lysine et les polymères à base de polyéthylèneimine (PEI). Il existe deux formes de PEI, les PEI linéaires, qui contiennent des amines secondaires une amine primaire terminale, et les PEI branchés, contenant des amines primaires, secondaires et tertiaires. Ces polymères de PEI sont particulièrement efficaces pour

l'échappement des endosomes (voir page 58) tandis que les polyplexes formés avec la poly-L-lysine requièrent des agents endosomolytiques pour une internalisation efficace dans le cytoplasme ou le noyau. Cependant, une toxicité cellulaire à forte concentration a également été rapportée pour ces polymères, et surtout pour le PEI (Fischer et al. 2003). Des polymères cationiques comportant des cyclodextrines ont été développés et se sont montrés très efficaces pour l'internalisation de siARN, avec une toxicité moindre à celle des polymères cationiques non modifiés (Kulkarni et al. 2012). Un polymère à base de cyclodextrines (Figure 18A) est utilisé dans un essai clinique de phase Ib (conduit par Calando Pharmaceuticals et Arrowhead Reasearch Corporation) pour vectoriser un siARN dirigé contre l'oncogène de la sous-unité 2 de la ribonucléotide réductase (RRM2). Les nanoparticules employées pour la vectorisation de ce siARN dans les cellules cancéreuses sont composées, en plus du polymère à base de cyclodextrines, d'un ligand de ciblage, la transferrine, induisant la fixation de la nanoparticule sur le récepteur de la transferrine qui est surexprimé par les cellules tumorales (Figure 18B). Ces nanoparticules, dénommées CALAA-01, contiennent également du PEG pour améliorer leur stabilité dans les fluides biologiques.

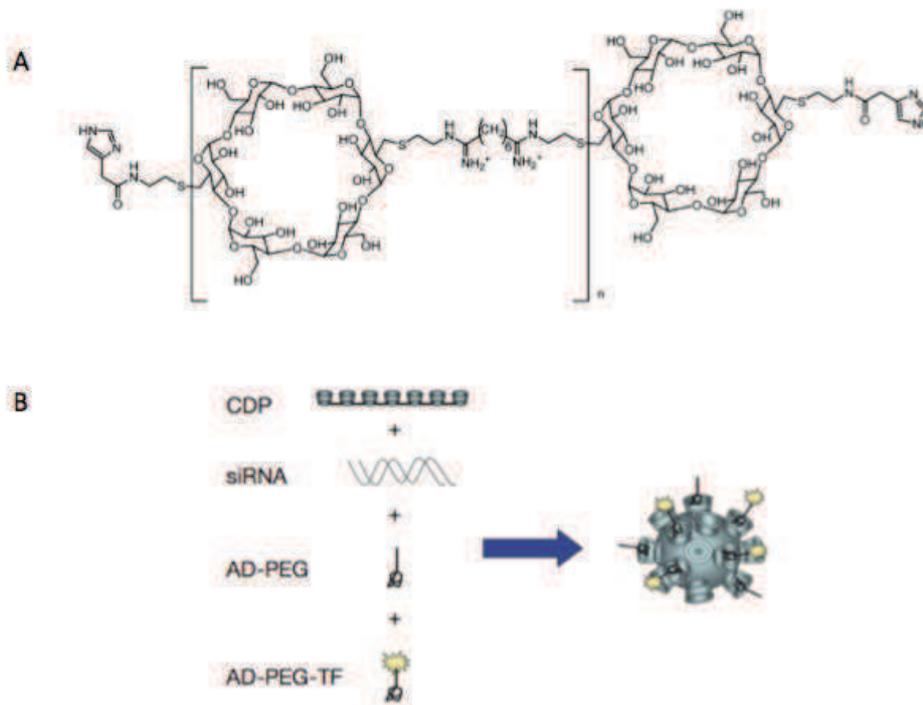


Figure 18 : Composition des nanoparticules CALAA-01.

A. Structure chimique du polymère à base de cyclodextrines (CDP) constituant la nanoparticule CALAA1 (d'après Gooding et al. 2012). B. Différents constituants de la nanoparticules et assemblage. CDP : polymère à base de cyclodextrines, siRNA : siARN dirigé contre l'oncogène RRM2, PEG : Polyéthylène glycol, AD : Adamantane (permet la fixation sur le polymère), TF : Transferrine (ligand de ciblage) (d'après Davis et al. 2010).

Ces particules CALAA-01 (moins de 100 nm de diamètre) sont utilisées pour le traitement de patients atteints de mélanomes métastatiques par injections intraveineuses et cet essai clinique constitue le premier impliquant un système d'internalisation ciblée d'un siARN (Davis et al. 2010).

Ces lipoplexes et polyplexes peuvent ainsi être fonctionnalisés avec différents ligands de ciblage des cellules, comme des peptides spécifiques ou des anticorps (Koren et al. 2012). En l'absence de système de ciblage, ces particules interagissent avec la surface cellulaire par des liaisons électrostatiques non spécifiques entre les charges positives des complexes et les charges négatives de la membrane plasmique. Les molécules de protéoglycanes comme les héparanes sulfates (voir page 80) sont suspectées être impliquées dans la fixation à la membrane (Khalil et al. 2006). Le mécanisme d'internalisation identifié majoritairement pour ces particules est l'endocytose. Les mécanismes d'échappement aux endosomes diffèrent pour les deux types de transporteurs puisqu'ils font intervenir une fusion entre les membranes endosomales et liposomale dans le cas lipoplexes et une libération par rupture de la membrane endosomale sous l'effet de la pression osmotique (effet éponge à protons) dans le cas des polyplexes (voir pages 58-59).

ii) Nanoparticules

Les nanoparticules sont des structures sphériques dont la taille est de l'ordre du nanomètre, composées de polymères naturels ou synthétiques. Le Poly(lactic-co-glycolic acide) (PGLA) est un polymère biodégradable pouvant être utilisé dans la formulation de ces nanoparticules. Ces nanoparticules de PGLA peuvent être utilisées pour l'encapsulation de divers acides nucléiques. Ceux-ci sont incorporés au sein de la matrice de polymère, ou bien adsorbés à la surface de la nanoparticule, par interactions électrostatiques avec des polymères cationiques (tels que le PEI ou le chitosan) qui peuvent être ajoutés à la matrice. Des nanoparticules de PGLA ont été utilisées pour l'internalisation de PNA capables d'induire une recombinaison génomique dans les gènes *CCR5* (codant le co-récepteur impliqué dans l'internalisation cellulaire du VIH) et *β -globine*, par formation de triplexes, en présence d'un ADN donneur. Ces nanoparticules sont internalisées avec succès dans des cellules souches hématopoïétiques humaines (McNeer et al. 2011) et leur injection systémique dans des souris humanisées induit une recombinaison génomique spécifique dans les cellules hématolymphoïdes (McNeer et al. 2013).

b) Aptamères

Certains acides nucléiques (ARN ou ADN simple-brins), appelés aptamères, sont capables de reconnaître et de lier spécifiquement une protéine d'intérêt grâce à leur structure tridimensionnelle. Il est possible d'utiliser ces molécules pour internaliser des acides nucléiques spécifiquement dans certains types cellulaires. Les cellules de cancer de la prostate expriment à leur surface un antigène appelé PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigène). Un aptamère ARN reconnaît spécifiquement cette protéine PSMA et cet aptamer a été fusionné à un siARN (Figure 19) dirigé contre un gène de survie cellulaire (*Plk1* ou *Bcl2*). L'injection intratumorale ou systémique de cette chimère inhibe la croissance des tumeurs surexprimant l'antigène PSMA dans des souris athymiques (Dassie et al. 2009).

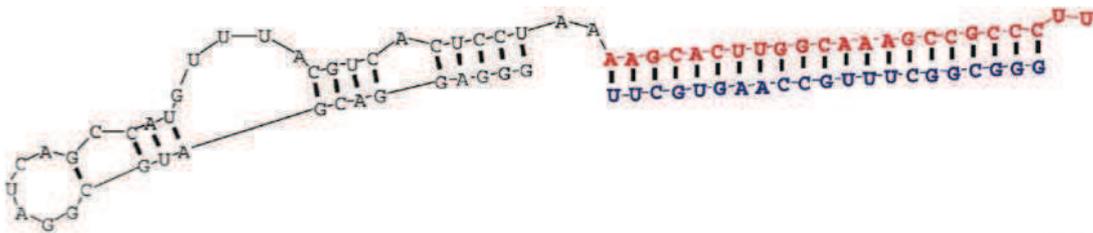


Figure 19 : Structure de la chimère entre l'aptamère anti PSMA et un siARN dirigé contre le gène de survie cellulaire *Plk1* (d'après Dassie et al. 2009).

noir : aptamère spécifique de l'antigène PSMA ; rouge : brin guide (antisens) ; bleu : brin passager (sens). Deux nucléotides (UU) sortants en 3' du brin antisens favorisent la reconnaissance du brin guide dans le complexe RISC.

La glycoprotéine d'enveloppe gp120 du VIH-1, exprimée à la surface des particules virales et des cellules infectées, constitue également une cible pour un aptamère reconnaissant spécifiquement cette protéine. Des études ont montré qu'il est possible de vectoriser un siARN dirigé contre les protéines Tat et Rev, avec cet aptamère, dans des cellules en culture exprimant la gp120. L'internalisation sélective par endocytose de cette chimère aptamère-siARN (Figure 20A) dans les cellules infectées par le VIH-1 résulte en l'inhibition du transcrit et de la réplication virale (Zhou et al. 2008; Zhou et al. 2009). L'originalité et l'efficacité de cette approche pour inhiber la réplication virale, reposent sur une coopérativité entre les deux constituants de la chimère, l'aptamère inhibant l'entrée du virus par compétition avec la fixation du récepteur CD4 à la gp120, et le siARN inhibant l'expression

de tat/rev. Une stratégie de conjugaison non covalente avec ce même aptamère a également été développée et permet de moduler simplement la chimère par n'importe quelle séquence de siARN (Figure 20B). Dans cette chimère non covalente, une séquence de liaison 'sticky bridge' riche en GC (16 bases), est ajoutée à l'extrémité 3' de l'aptamère. La séquence complémentaire à cette séquence de liaison est quant à elle ajoutée à un des deux brins du siARN, et la chimère est ensuite formée par simples appariements Watson-Crick. Des injections intraveineuses d'un cocktail d'aptamères anti-gp120, conjugués ainsi à trois différents siARN ciblant des transcrits de protéines impliquées dans la réplication virale (Tat/Rev, CD4 et Transportine-3 (TNPO3)), dans un modèle de souris humanisées infectées par le VIH conduisent à l'inhibition de la charge virale et de la déplétion en cellules T CD4⁺ (Zhou et al. 2013).

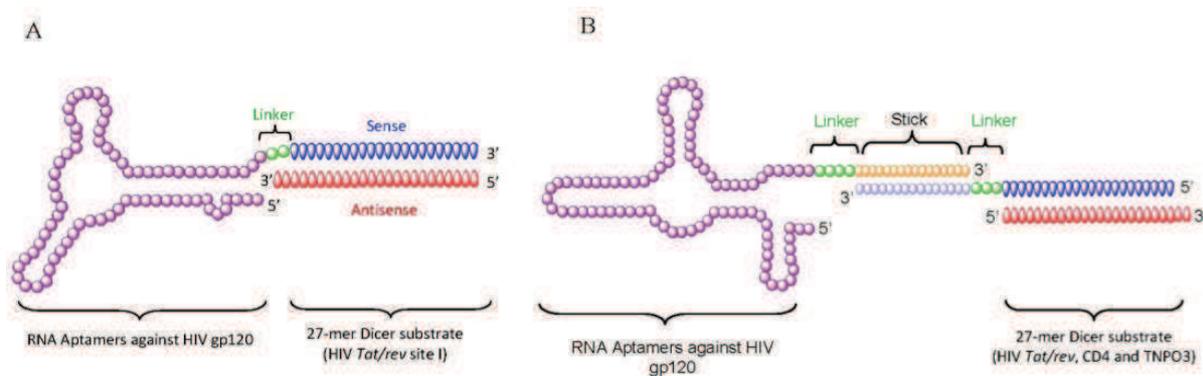


Figure 20 : Structures schématiques des chimères constituées de l'aptamère anti-gp120 et d'un siARN (d'après Zhou et Rossi 2010).

A. L'aptamère anti-gp120 et le siARN sont liés covalamment. Le siARN cible un exon commun dans le transcript de *tat/rev* de HIV-1. La séquence de siARN au sein de la chimère est une séquence 27-mer qui sera clivée par Dicer pour générer un siARN 21-mer incorporé dans le complexe RISC. B. Chimère constituée de l'aptamère anti gp-120 et d'un siARN modulable, liés par appariements Watson-Crick au niveau d'une séquence de liaison de 16 bases riche en GC. Cette séquence de liaison est espacée de l'aptamère et du siARN par des linkers constitués d'une séquence charnière de trois atomes de carbone (C3), apportant une flexibilité spatiale et structurale.

Les aptamères, pouvant être considérés comme des versions nucléiques des anticorps, sont donc des outils très prometteurs pour la vectorisation d'une variété de molécules dans des cellules cibles. Leur nature nucléique constitue une caractéristique intéressante pour leur utilisation en tant que vecteur : absence d'immunogénicité *in vivo*, haute sensibilité et spécificité de fixation à l'antigène, faible toxicité cellulaire, synthèse chimique simple et directe avec possibilité d'introduction de modifications chimiques... Des optimisations pour rendre les conjugués encore plus fonctionnels ont été parfois proposées, telles que des

troncatures d'aptamères ou des multimérisations, ou encore des modulations dans la méthode de couplage entre l'aptamère et le composé (Zhou & Rossi 2010).

c) Petites molécules organiques et peptides

Une stratégie pour augmenter l'internalisation des siARN et oligonucléotides antisens est de les conjuguer à de petites molécules organiques, telles que le cholestérol ou des vitamines, ou à des peptides. Ces molécules sont naturellement absorbées par certains tissus, *via* des récepteurs spécifiques.

La nature lipophile du cholestérol (Figure 21A) fait de cette petite molécule un transporteur adéquat pour les acides nucléiques. La première mise en évidence d'activité biologique d'un siARN *in vivo* par injection systémique a été réalisée avec un siARN dirigé contre l'apolipoprotéine B et comportant une molécule de cholestérol en 3' du brin sens (Soutschek et al. 2004). Cette modification augmente la stabilité de la molécule dans le plasma et ce conjugué inhibe l'ARNm de l'apolipoprotéine B dans le foie et le jejunum chez la souris. Cette stratégie s'est également révélée efficace pour le ciblage *in vivo* du micro ARN miR-122 par un oligonucléotide 2'-OMe phosphorothioate comportant un cholestérol en 3' (Krützfeldt et al. 2005). Une investigation du mécanisme d'internalisation cellulaire (Wolfrum et al. 2007) a montré que les conjugués cholestérol-siARN interagissent avec des lipoprotéines, notamment les HDL (High Density Lipoprotein) et LDL (Low Density Lipoprotein). Les conjugués, ainsi liés aux LDL ou HDL, interagissent avec les récepteurs aux LDL et aux HDL, respectivement. L'internalisation des complexes lipoprotéines/siARN fait également intervenir une protéine transmembranaire appelée Sid1, homologue de la protéine Systemic RNAi Deficient-1 de *C. elegans*, nécessaire pour une activité d'ARN interférent systémique. Les conjugués liés aux LDL sont principalement internalisés dans le foie, tandis que les conjugués liés aux HDL sont internalisés dans divers tissus (ovaires, reins, foie, glande surrénale), qui expriment fortement le récepteur scavenger de classe B et de type I (SR-BI), impliqué dans l'internalisation sélective du cholestérol des particules HDL.

Certaines vitamines ont également été rapportées pour leur activité de vectorisation des acides nucléiques (Marlin et al. 2010). Par exemple, l' α -tocopherol (Figure 21B), un des huit isomères de la vitamine E, conjugué en 5' du brin antisens d'un siARN ciblant l'apolipoprotéine B, provoque l'absorption du conjugué dans le foie de souris traitées en

injection intraveineuse (Nishina et al. 2008). Le mécanisme précis de cette internalisation dans les hépatocytes n'est pas connu, ni le récepteur impliqué. Cependant, les expériences sur des hépatocytes en culture mettent en évidence la nécessité de la présence de sérum pour l'internalisation, suggérant une fixation à des protéines sériques. En effet, plusieurs protéines sériques telles que les lipoprotéines, l'afamine ou les protéines SEC14L2, SEC14L3 et SEC14L4 sont connues pour interagir avec l' α -tocopherol. Egalement, la riboflavine, ou vitamine B2, a été utilisée pour l'internalisation de PNA antisens dans des cellules HeLa par endocytose (Marlin et al. 2012). Le mécanisme d'internalisation de la riboflavine est peu connu mais ferait intervenir un transport par une protéine RCP (Riboflavine Carrier Protein), et plusieurs récepteurs spécifiques ont été identifiés (RFT pour RiboFlavine Transporters). Un autre exemple est l'utilisation de la vitamine A (rétinol) pour l'internalisation de siARN encapsulés dans des liposomes couplés à cette vitamine, dans les cellules hépatiques étoilées pour le traitement de la fibrose hépatique (Sato et al. 2008).

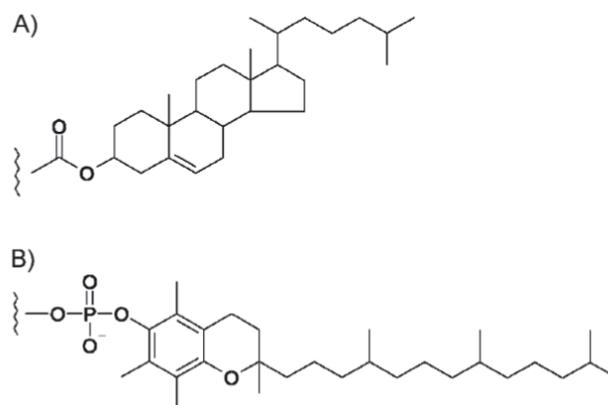


Figure 21 : Structures chimiques de petites molécules organiques utilisées pour la vectorisation des acides nucléiques (d'après Marlin et al. 2010).

A) cholestérol B) vitamine E (α -tocopherol)

Certaines études relatent également l'utilisation de petits peptides, ligands de récepteurs cellulaires spécifiques, pour l'internalisation des acides nucléiques dans différents types cellulaires. Des cellules cancéreuses peuvent être ciblées spécifiquement par un peptide RGD qui reconnaît avec une forte affinité les intégrines de type $\alpha\beta3$ surexprimées à leur surface. Le couplage covalent de ce peptide à un oligonucléotide 2'-OMe phosphorothioate correcteur d'épissage permet son internalisation sélective dans les cellules tumorales

surexprimant les intégrines $\alpha\beta3$ (Alam et al. 2008). Un autre exemple intéressant concerne le couplage d'un PNA dirigé contre le gène *c-myc*, avec une forme biologiquement active de la testostérone, la dihydrotestostérone (Boffa et al. 2000). L'hormone couplée au PNA permet de délivrer le conjugué sélectivement dans les cellules exprimant le récepteur nucléaire aux androgènes (AR). Enfin, nous citerons l'exemple d'un petit peptide analogue de l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-I), utilisé pour la vectorisation d'un siARN par endocytose *via* le récepteur à l'IGF-1. Ce peptide, couplé en 5' du brin sens du siARN, permet l'internalisation du conjugué et l'activité biologique du siARN dans des cellules MCF7 surexprimant le récepteur à l'IGF-I (Cesarone et al. 2007). Ce même peptide a également été utilisé pour un ciblage spécifique des cellules exprimant le récepteur à l'IGF-I par un PNA (Basu & Wickstrom 1997).

L'avantage de ces stratégies aptamères, peptides et petites molécules organiques, mettant en jeu des récepteurs cellulaires exprimés différemment selon les tissus, est de permettre un ciblage spécifique des cellules exprimant le récepteur impliqué. Ceci permet potentiellement de pouvoir diminuer la concentration en molécule active injectée et de minimiser les effets non spécifiques (Marlin et al. 2010).

d) Cell Penetrating Peptides (CPP)

Les CPP sont des peptides, généralement de 10 à 30 acides aminés, possédant généralement une charge nette positive à pH physiologique (riches en acides aminés basiques) et ayant la capacité de provoquer l'internalisation cellulaire de différents composés, tels que des peptides ou des acides nucléiques (siARN, aptamers et oligonucléotides antisens).

La capacité de certains peptides à traverser naturellement les membranes biologiques a été mise en évidence en 1988 suite à des études structurales et fonctionnelles sur le transactivateur Tat du VIH. Ces études ont montré que la protéine purifiée est internalisée dans des cellules en culture, en absence d'agents de transfection et induit la transactivation du promoteur viral (Frankel & Pabo 1988). Cette capacité d'internalisation est conférée par une courte région de la protéine comprise entre les acides aminés 48 et 60 (Vivès et al. 1997). Différentes études ont ensuite démontré la capacité de peptides issus de Tat à provoquer l'internalisation de divers composés liés covalamment, incluant des protéines entières comme la β -galactosidase ou la HRP (Horseradish Peroxidase), dans des cellules en culture et *in vivo*

(Fawell et al. 1994; Schwarze et al. 1999). Quelques années plus tard, la capacité de l'homéodomaine (acides aminés 1 à 60) du facteur de transcription Antennapedia chez la drosophile à pénétrer dans le noyau de neurones en culture a été mise en évidence (Joliot et al. 1991). Une séquence de 16 acides aminés, appelée pénétratine (pAntp) a été identifiée comme étant responsable de cette aptitude d'internalisation (Derossi et al. 1994). Ce peptide pAntp est également efficace pour promouvoir l'internalisation de composés bioactifs dans les cellules. Par exemple, son couplage à un peptide inhibiteur de la protéine kinase C (PKC) (Théodore et al. 1995) ou à un oligonucléotide antisens 15-mer (Allinquant et al. 1995), permet aux conjugués d'être internalisés dans des neurones en culture.

i) Classification

Au cours des vingt dernières années, plus de cent séquences de CPP (variant de 5 à 40 acides-aminoés) ont été décrites capables d'être internalisées dans les cellules de mammifères, plantes et de bactéries, médiant le transport d'une variété de composés, auxquels ils sont liés covalamment ou non covalamment (Koren & Torchilin 2012). Le Tableau 1 présente les principaux CPP décrits jusqu'à présent dans la littérature.

CPP	séquence (N- vers C-ter)	Origine	références
<i>dérivés de protéines naturelles</i>			
Tat48-60	GRKKRRQRRRPPQ	transactivateur de transcription du VIH	(Vivès et al. 1997)
Pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK	homéodomaine d'antennapedia	(Derossi et al. 1994)
<i>chimériques</i>			
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	galanine + mastoporan	(M Pooga et al. 1998)
MPG	GALFLGFLGAAGDTMGAWSQPKKKRKV	gp41 du VIH-1 + NLS de SV40	(Morris et al. 1997)
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	RT du VIH + NLS de SV40	(Morris et al. 2001)
<i>synthétiques</i>			
(R/W) ₉	RRWRRRWR	dérivé de la pénétratine	(Delaroche et al. 2007)
MAP	KLALKLALKALKALKLA	<i>de novo</i>	(Oehlke et al. 1998)
(R-Ahx-R) ₄	RAhxR RAhxR RAhxR RAhxRRAhxR	dérivé des oligoarginines	(Abes, Moulton, et al. 2006)
Polyarginines	R _n (6 < n < 12)	dérivés du peptide Tat	(Mitchell et al. 2000)

Tableau 1 : Description des principaux CPP décrits dans la littérature.

Ahx : acide 6-aminohexanoïque ; MAP : Model Amphipathic Peptide

Malgré leur grande variabilité de séquences, une classification des CPP selon leurs caractères physicochimiques est possible et implique trois principales catégories : les

cationiques, les amphipathiques et les hydrophobes (Milletti 2012). La grande majorité (83%) des CPP ont une charge nette positive, la petite proportion de CPP anioniques ne constituant pas à elle seule une catégorie. Les CPP anioniques sont assignés aux catégories de CPP hydrophobes ou amphipathiques.

Les CPP classés dans la catégorie purement cationique sont des CPP n'ayant pas de caractère hydrophobe ou amphipathique (Milletti 2012). Les principaux représentants de CPP cationiques sont les bien connus Tat (RKKRRQRRR), les peptides oligoarginines (R_9 , $R_8\dots$), et les séquences NLS.

Parmi les CPP amphipathiques, on distingue les amphipathiques primaires, qui possèdent dans leur séquence un segment de résidus hydrophobes et un segment de résidus hydrophiles (exemples MPG et Pep-1), et les amphipathiques secondaires. Les CPP amphipathiques secondaires possèdent un caractère amphiphile révélé par la structure secondaire (en hélice alpha ou feuillet- β), avec le positionnement de résidus hydrophobes sur une face de la structure et de résidus hydrophiles sur l'autre face (exemples : Model Amphipathic Peptide (MAP), GALA, CADY). Une dernière classe de CPP amphipathiques à considérer est représentée par les CPP amphipathiques riches en prolines (exemple : peptide SAP, de séquence $(VRLPPP)_3$), caractérisés par la formation d'une hélice particulière polyproline II (PPII) (Milletti 2012).

Enfin, sont considérés comme CPP hydrophobes (seulement 15% environ des CPP ; exemples : les pentapeptides BIP et Pep-7), les CPP ne contenant que des résidus hydrophobes, de charge nette faible, ou possédant un motif ou un groupement chimique hydrophobe crucial pour l'internalisation (Milletti 2012).

Une autre méthode de classification se base sur l'origine des CPP et différencie trois classes : les peptides dérivés de protéines naturelles (le plus souvent de protéines de fixation à l'ADN ou à l'ARN, d'homéoprotéines, de peptides antimicrobiens, de protéines virales ou de peptides signal), les peptides chimériques formés de la fusion entre deux séquences naturelles, et les peptides synthétiques, issus d'une conception rationnelle (Bechara & Sagan 2013).

ii) Mécanismes d'internalisation

Les mécanismes impliqués dans l'internalisation cellulaire des CPP ou des conjugués CPP-composé sont divers et controversés. Les premières données, notamment pour les peptides Tat et pénétratine, indiquaient une internalisation passive à travers la membrane

plasmique, *via* un mécanisme énergie-indépendant et récepteur indépendant (Derossi et al. 1994; Vivès et al. 1997; Derossi et al. 1996). Cependant, la plupart des expériences initiales de microscopie étaient réalisées sur des cellules fixées, et il a été montré en 2003 que les protocoles de fixation modifiaient la localisation intracellulaire des peptides liés à un fluorophore (Richard et al. 2003). Dès lors, les études de localisation furent menées sur des cellules vivantes, non fixées, et l'endocytose apparaît aujourd'hui comme la principale voie d'internalisation des CPP (Sebbage 2009). Toutes les voies de pinocytose ont été décrites comme impliquées dans l'internalisation des CPP et CPP-cargaison. De plus, certaines études suggèrent l'interaction avec un récepteur, précédant l'internalisation. Par exemple, des complexes non covalents entre des oligonucléotides et le peptide PepFect14 sont internalisés dans les cellules HeLa suite à une interaction avec des récepteurs scavenger de classe A (SCARA) (Ezzat et al. 2012).

Malgré l'évidence de l'utilisation de l'endocytose comme voie d'entrée des CPP, des études apportent également des arguments forts en faveur d'une translocation directe à travers la membrane (Thorén et al. 2004; Jiao et al. 2009; Rydström et al. 2011). Ce processus, énergie indépendant, est évalué en quantifiant l'internalisation à 4°C ou en condition de déplétion chimique en ATP. Notons que les mesures réalisées à 4°C tendent à sous-évaluer la part de translocation directe, la fluidité et la dynamique membranaires étant également diminuées à faible température. Trois principaux mécanismes de translocation directe ont été proposés (Bechara & Sagan 2013). Le premier impliquerait l'encapsulation des peptides dans des micelles inversées, par invagination de la membrane et réorganisation des lipides, suite à l'interaction des résidus basiques du CPP avec des phospholipides négativement chargés (Figure 22A) (Alves et al. 2008). Un second mécanisme correspond à la formation de pores transitoires dans la membrane plasmique, qui permettent une diffusion passive des peptides vers le cytoplasme (Figure 22B). L'interaction entre les chaînes latérales des résidus positifs du CPP et les phospholipides négatifs mène à l'accumulation des peptides au contact de la membrane et à l'amincissement de cette dernière, aboutissant à la formation d'un pore (Deshayes et al. 2006; Herce et al. 2009). Enfin, un modèle est en faveur d'une translocation dite adaptative, pour les CPP riches en arginines (Figure 22C). L'interaction du groupement guanidinium des arginines et les têtes polaires des phospholipides par formation de liaisons hydrogène bidentées, masquerait la charge du peptide, atténuant sa polarité et lui permettant de diffuser à travers la membrane, de manière assistée par le potentiel membranaire (Wender et al. 2008; Rothbard et al. 2004).

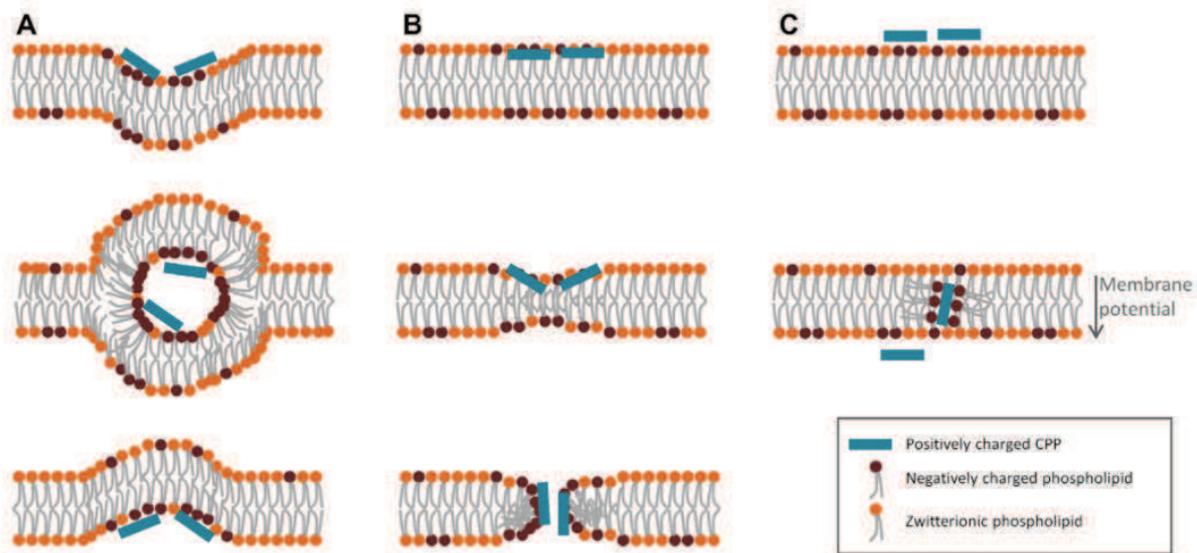


Figure 22 : Principaux mécanismes de translocation directe des CPP dans les cellules (d'après Bechara et Sagan 2013).

(A) Modèle de formation de micelles inverses, induisant l'encapsulation transitoire et la libération du peptide dans le milieu intracellulaire. (B) Modèle de formation de pores transitoires à travers lesquels les peptides peuvent diffuser passivement. (C) Modèle de translocation 'adaptative', mettant en jeu des interactions entre des groupements guanidinium et les têtes polaires des lipides négativement chargés, permettant aux peptides de diffuser à travers la membrane plasmique.

Les mécanismes impliqués dans l'internalisation des CPP et des conjugués CPP-cargaion sont donc complexes et font intervenir différents processus, non mutuellement exclusifs. En effet, un même CPP peut être internalisé par différentes voies d'endocytose en même temps (Duchardt et al. 2007) et son internalisation peut impliquer à la fois l'endocytose (énergie-dépendante) et la translocation directe (énergie-indépendante) (Jiao et al. 2009). Notamment, la nature du mécanisme impliqué peut être dépendante de la concentration en peptide, avec une prédominance de l'endocytose à faible concentration, et l'implication d'une translocation directe à partir d'un certain seuil de concentration, généralement autour de 5 μM (Said Hassane et al. 2010; Duchardt et al. 2007; Ziegler & Seelig 2011). Au contraire, certains exemples rapportent une internalisation par translocation directe à faibles concentrations en CPP et l'intervention supplémentaire de l'endocytose à plus fortes concentrations (Jiao et al. 2009; Bechara et al. 2013). De nombreux autres paramètres ont été décrits comme capables d'influencer le mode d'internalisation des CPP ou des CPP-cargaion, tels que la nature et la taille du composé à internaliser (El-Andaloussi et al. 2007), la lignée cellulaire considérée (Mueller et al. 2008), la nature de la liaison entre le CPP et le composé, la structure secondaire du CPP, le temps d'incubation, l'état physiologique des cellules... De plus, les

expériences utilisées pour la discrimination entre les différentes voies d'endocytose impliquent souvent l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de voies définies, dont la spécificité est parfois limitée, compliquant l'interprétation des résultats obtenus (Vercauteren et al. 2010). Ceci souligne l'importance de combiner l'utilisation de différentes approches, notamment par des expériences de microscopie (recherche de colocalisations avec des marqueurs de voies d'endocytose) ou l'utilisation de protéines dominant négatifs ou d'ARN interférents dirigés contre des protéines spécifiques de voies définies.

iii) Interactions avec la membrane plasmique

Quel que soit le mécanisme d'internalisation, la première étape est l'interaction du CPP avec la membrane plasmique. Des incertitudes subsistent sur la question du ou des déterminants membranaires impliqués dans cette interaction. Si les études initiales proposaient une interaction électrostatique avec les têtes polaires lipidiques de la membrane (Drin et al. 2001), un nombre important d'études met en évidence l'importance de certaines molécules de protéoglycanes. Les protéoglycanes sont des constituants essentiels de la matrice extracellulaire et sont présents à la surface des cellules. Ils sont constitués d'une protéine centrale, sur laquelle sont liées une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG), attachées à des sites spécifiques. Les GAG sont des polysaccharides non branchés qui diffèrent entre eux selon leur composition en saccharides. Parmi eux, on distingue les héparanes sulfates (HS), les chondroitines sulfates (CS), les dermatanes sulfates (DS), les kératanes sulfates (KS) et l'acide hyaluronique (seul GAG qui n'est pas lié à une protéine centrale). Les principaux protéoglycanes membranaires sont appelés syndécans et glypicans (Figure 23), et contiennent principalement des chaînes d'HS (Häcker et al. 2005). Les glypicans sont des protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG) liés à la membrane par une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol). Les syndécans sont transmembranaires et comportent jusqu'à cinq sites d'attachement aux GAG (CS, DS et principalement HS).

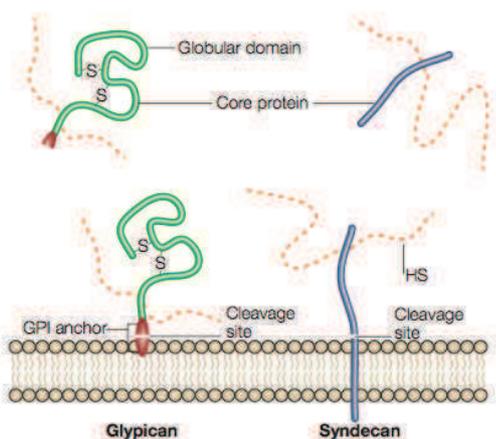


Figure 23 : Structure des protéoglycanes membranaires (HSPG) (d'après Häcker et al. 2005).

Les glypicans sont reliés à la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) clivable et comportent un domaine N-terminal globulaire stabilisé par des liaisons disulfures. Les sites d'attachement des HS sont proches de l'extrémité C-terminale. Les syndécans sont transmembranaires et portent des sites d'attachement aux HS près de leur extrémité N-terminale.

De part l'abondance de leurs groupes carboxylates et sulfates, les GAG sont une source importante de polyanions, présente à la surface de presque tout type cellulaire. Des expériences notamment de compétition avec des analogues solubles de GAG (exemple : héparine), de traitement des cellules par des enzymes clivant spécifiquement certains GAG (exemple : héparinase III), ou de mesure d'internalisation dans des lignées cellulaires déficientes dans la biosynthèse de certains GAG, ont permis de mettre en évidence une interaction électrostatique entre de nombreux CPP et les GAG, et surtout avec les HS (Tyagi et al. 2001; Wadia et al. 2004; Belting 2003; Suzuki et al. 2002; Bechara et al. 2013). Cette interaction est susceptible d'induire un regroupement de GAG à la surface des cellules, à l'origine de l'activation d'un signal intracellulaire, d'un remodelage du cytosquelette d'actine, et de l'internalisation *via* endocytose ou translocation directe (Milletti 2012; Ziegler & Seelig 2008; Bechara et al. 2013). Les résidus positivement chargés au sein du CPP sont donc particulièrement importants pour établir ces liaisons électrostatiques avec la membrane plasmique. Les peptides riches en arginines semblent plus efficacement internalisés que les peptides riches en lysines ou histidines (Mitchell et al. 2000; Amand et al. 2008). Par exemple, une étude comparant l'internalisation de la pénétratine à des analogues PenArg et PenLys, enrichis en arginines et lysines, respectivement, a montré que l'analogue PenArg est dix fois plus internalisé que l'analogue PenLys, lui même moins internalisé que la pénétratine (Amand et al. 2008). La particularité de l'arginine repose notamment sur sa capacité à établir deux liaisons hydrogènes bidentées entre le groupement guanidinium de sa chaîne latérale et le

groupement sulfate, phosphate ou carboxylate anioniques présents à la surface des membranes (Rothbard et al. 2004) (Figure 24). D'autre part, la présence de plusieurs résidus basiques dans la séquence d'un CPP peut induire une répulsion électrostatique entre ces résidus, qui est diminuée dans le cas des lysines grâce au pKa plus faible de leur chaîne latérale (en comparaison à celui des arginines), entraînant une déprotonation du groupe amino. Pour les arginines, cette répulsion de charges peut-être diminuée par interaction du groupement guanidinium avec un contre-ion négatif, tel qu'un groupement phosphate (Figure 24) (Gooding et al. 2012). Il en résulte une plus grande stabilité thermodynamique des paires d'ions impliquant le groupement guanidinium au sein des peptides polyarginines en comparaison à l'arginine isolée (Sakai & Matile 2003).

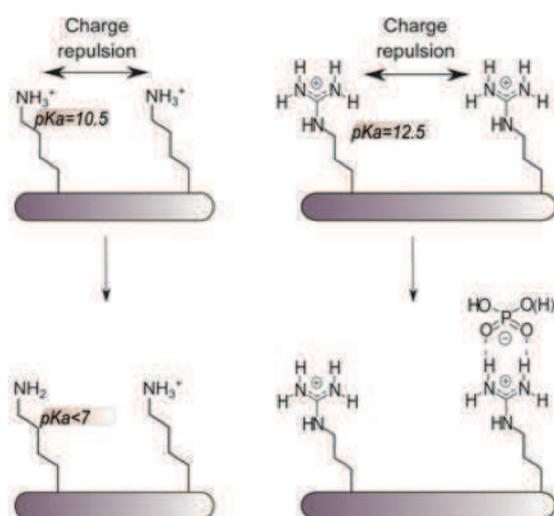


Figure 24 : Réduction de la répulsion de charge par les lysines et les arginines (d'après Gooding et al. 2012).

Le pKa du groupe amino de la lysine étant plus faible que le pKa du groupement guanidinium de l'arginine, résultant en une déprotonation du groupe amino et en une réduction de la répulsion de charge entre les lysines et les autres groupes cationiques. Pour les arginines, la charge est neutralisée par la formation de liaisons hydrogènes bidentées entre le groupement guanidinium et les anions tels que les phosphates.

Le devenir des peptides et leur dissociation des héparanes sulfates après entrée par endocytose est également une question non résolue. Les résultats obtenus par Fuchs et Raines en 2004 pour le peptide nonaarginine (R₉) suggèrent un mécanisme selon lequel les complexes peptide R₉-HS sont internalisés par endocytose, suivi du clivage des HS dans les endosomes par les héparanases, entraînant la libération des peptides et leur permettant de s'échapper des endosomes vers le cytoplasme en déstabilisant la membrane endosomale

(Fuchs & Raines 2004) (Figure 25). Les peptides riches en arginines semblent en effet particulièrement efficaces pour promouvoir l'échappement endosomal. Une étude utilisant des liposomes dont la surface a été modifiée avec une forte densité de peptides R₈ ou K₈, met en évidence la capacité unique des arginines à stimuler la libération des endosomes par fusion entre les membranes du liposome et de l'endosome. Cette libération est possible à pH neutre (endosomes précoces) comme à pH acide (endosomes tardifs) pour les liposomes modifiés avec R₈, tandis qu'elle n'est possible qu'à pH neutre pour les liposomes modifiés avec K₈ (El-Sayed et al. 2008).

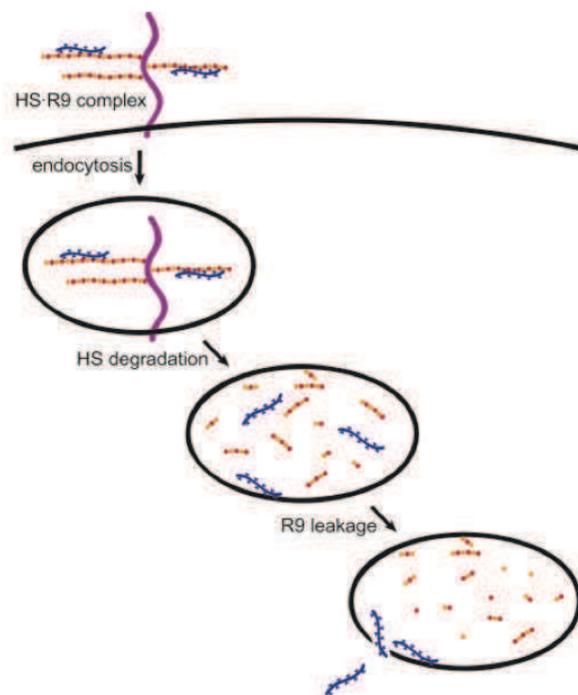


Figure 25 : Mécanismes proposés pour l'internalisation de R₉ dans les cellules CHO (d'après Fuchs et Raine 2004).

R₉ se lie aux HS à la surface des cellules et le complexe est internalisé par endocytose. Dans les endosomes, les HS sont dégradées par les héparanases. Le peptide, ainsi libéré, s'échappe des vésicules d'endocytose en perturbant la membrane endosomale.

iv) Stratégie covalente / non covalente

La majorité des stratégies basées sur l'utilisation de CPP repose sur un couplage covalent entre le CPP et la molécule à internaliser. Ce couplage est réalisé chimiquement ou par clonage et expression d'une protéine de fusion CPP-protéine. Des règles concernant le type de liaison optimal entre le CPP et le composé à internaliser n'ont pas encore été définies.

Il existe différentes liaisons chimiques possibles, stables (thiol maléimide ou thioether) ou clivables (liaison ester, clivable par les estérases cellulaires, ou pont disulfure, réductible dans l'environnement intracellulaire).

Certaines études (Aubry et al. 2009; Torres et al. 2011; Åmand et al. 2012) mettent en évidence l'importance des thiols pour l'internalisation, suggérant l'existence de réactions d'échange avec des thiols membranaires, catalysées par des protéines oxydoréductrices (proteine disulfide isomerase et thioredoxines). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ces échanges (Torres & Gait 2012). L'hypothèse la plus probable consiste en l'attaque du pont disulfure du conjugué par un thiol, conduisant à la formation d'un complexe entre le composé à internaliser et la protéine membranaire (Figure 26a). Selon un second mécanisme possible, la formation de ce complexe pourrait être initiée par l'attaque d'un thiol du composé sur une protéine membranaire contenant un pont disulfure (Figure 26b). Enfin, la possibilité de la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre deux cystéines libres (l'une sur la protéine membranaire, l'autre sur le composé), n'est pas exclue (Figure 26c). Le composé, ainsi lié à la protéine membranaire, serait ensuite internalisé par endocytose et éventuellement libéré dans l'environnement réducteur du cytoplasme.

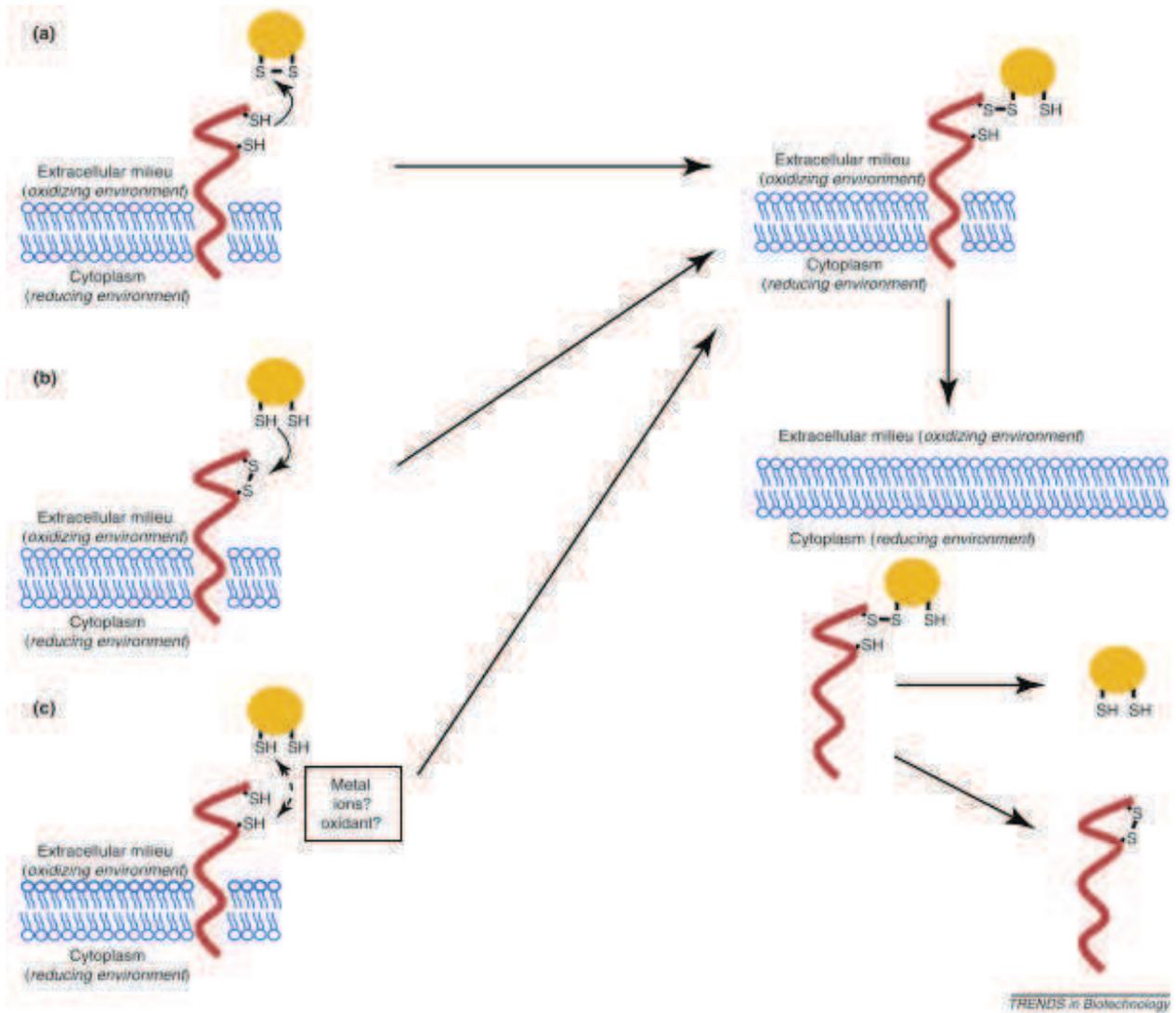


Figure 26 : Mécanismes possibles d'échanges des thiols entre un CPP et une protéine membranaire (d'après Torres et Gait 2012).

(a) attaque d'un thiol réactif de la protéine membranaire sur le pont disulfure au sein du peptide (b) attaque d'un thiol réactif du peptide sur un pont disulfure membranaire (c) formation d'un pont disulfure entre deux thiols réactifs, l'un sur le peptide, l'autre sur la protéine membranaire, catalysée potentiellement par des ions métalliques ou des agents oxydants. Dans tous les cas, ces réactions aboutiraient à la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre le peptide et la protéine membranaire, stimulant l'internalisation, qui sera réduit dans le cytoplasme ou l'endosome.

Les avantages d'un couplage covalent sont notamment le contrôle de la stoechiométrie entre le CPP et le composé et la reproductibilité de la synthèse du conjugué. Cependant, il existe un risque d'altération de l'activité biologique du composé, particulièrement dans le cas des siARN ou des oligonucléotides chargés. Toutefois, ce risque est limité dans le cas d'un lien réversible entre le composé et le CPP.

Une stratégie de couplage non covalent entre le composé et le CPP a été développée avec des peptides amphipathiques comportant un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe, qui forment des nanoparticules stables avec des protéines/peptides ou des acides nucléiques. Cette stratégie a été proposée en 1997 par l'équipe de Gilles Divita (Morris et al. 1997), avec le peptide chimérique MPG (27 résidus, GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV), dont le domaine hydrophobe est dérivé de la séquence de fusion de la protéine gp41 du VIH et le domaine hydrophile, riche en lysines, est dérivé de la séquence NLS de l'antigène T du SV40. Ces deux domaines sont séparés d'un domaine de liaison comportant une proline, conférant une flexibilité plus grande au peptide. Ce peptide présente une forte affinité (de l'ordre du nanomolaire) pour les acides nucléiques négativement chargés, simple ou double-brins. L'association avec les acides nucléiques est réalisée par des liaisons électrostatiques et hydrophobes, indépendamment de la séquence nucléique. Les interactions électrostatiques sont générées par les charges positives des lysines du domaine hydrophile et les charges négatives de l'acide nucléique. Des interactions intermoléculaires peptide/peptide *via* le domaine hydrophobe permettent ensuite de générer une 'cage' peptidique autour de l'acide nucléique. Les particules ainsi formées contiennent entre 20 et 40 molécules de peptide, selon la taille de l'acide nucléique (Deshayes et al. 2008). Cette stratégie utilisant le peptide MPG est efficace pour internaliser aussi bien de l'ADN plasmidique, que des oligonucléotides antisens chargés négativement (PO, LNA, PS...), ou des siARN (Deshayes et al. 2008). Pour délivrer les siARN dans le compartiment où se trouve leur cible, c'est-à-dire le cytoplasme, le peptide MPG^{ΔNLS}, comportant une mutation dans la séquence NLS, est le plus efficace.

Le CPP Pep1 (21 résidus, KETWWETWWTEWSQPKKKRKV) diffère de MPG par le domaine variable hydrophobe, qui est une séquence riche en tryptophanes. Ce peptide permet l'internalisation cellulaire de petits peptides et protéines par l'approche non covalente (Morris et al. 2001), en engageant des interactions hydrophobes. Les particules ainsi formées contiennent de 15 à 20 molécules de Pep1 par molécule à internaliser. Des modifications de Pep1 ont été proposées afin d'élargir le potentiel de cette stratégie à d'autres types de composés. Par exemple, le peptide Pep2 (21 résidus, KETWFETWFTEWSQPKKKRKV), résultant de la substitution de deux tryptophanes en phénylalanines dans le domaine hydrophobe de Pep1, permet d'internaliser les PNA et d'analogues ioniques de PNA (HypNA-pPNA) (Morris et al. 2004). A partir de la séquence Pep2, des mutations et délétions ont été introduites afin d'identifier les résidus essentiels pour la formation de complexes stables avec les PNA et leurs analogues et pour augmenter leur internalisation. La séquence

optimisée, nommée Pep3 (15 résidus, KWFETWFETWPKKRK), permet le ciblage *in vivo* de la cycline B1 par un HypNA-pPNA, qui inhibe la croissance tumorale de xénogreffes de cellules de carcinome de prostate (PC3) chez la souris (Morris et al. 2004).

Plus récemment, le peptide amphipathique secondaire CADY (20 résidus, GLWRALWLLRSLWLLWKA) a été décrit pour sa capacité à se lier aux siARN par interactions électrostatiques et hydrophobes, augmentant leur internalisation dans une grande variété de lignées cellulaires, incluant des cellules en suspension et des lignées primaires (Rydström et al. 2011; Crombez et al. 2009).

Tous ces peptides sont acétylés en N-terminal et portent un groupement cystéamide en C-terminal, essentiels pour leur stabilité et leur internalisation. Ces complexes non covalents sont principalement internalisés par un mécanisme impliquant une translocation directe à travers la membrane et évitant la voie endosomale. Les premiers contacts avec la surface cellulaire impliquent là encore les protéoglycanes, induisant l'activation de la GTPase Rac1 et le remodelage du cytosquelette d'actine et déclenchant l'initiation du processus d'internalisation. L'interaction avec les phospholipides (principalement par le domaine hydrophobe) leur permet ensuite d'adopter une structure en hélice (Pep-1) ou en feuillet- β (MPG) et de s'insérer dans la membrane pour être internalisés par un mécanisme impliquant la formation de pores (Deshayes et al. 2008).

v) Conclusions

Les principales limitations des CPP *in vivo* sont leur sensibilité à la protéolyse résultant en une durée d'action réduite, et l'absence de ciblage cellulaire. La dégradation peut être réduite par l'utilisation d'acides aminés non naturels tels que les acides aminés de série D.

Certaines approches permettent d'apporter une spécificité de ciblage cellulaire aux CPP. Par exemple, une approche utilise des 'CPP activables', ou ACPP, constitués d'un domaine polyarginines covalamment attaché à un domaine polyanionique neutralisant et inactivant le domaine polyarginine par formation d'un complexe intramoléculaire. Ces deux parties sont reliées entre elles par un lien clivable par des métalloprotéases sécrétées par certaines cellules tumorales. Dans l'environnement proche des cellules tumorales, cet ACPP sera donc clivé, et la partie active (cationique) sera libérée et sélectivement internalisée dans les cellules tumorales (Jiang et al. 2004).

De nombreux CPP sont aujourd'hui en études précliniques et cliniques. Le premier essai clinique utilisant un CPP concernait l'utilisation d'un transporteur polyarginine pour l'internalisation de la cyclosporine dans le traitement topique du psoriasis. Cette molécule est entrée en phase II d'essais cliniques en 2003 (CellGate Inc.) mais son développement est aujourd'hui arrêté (Koren & Torchilin 2012). Sarepta Therapeutics développe des peptides oligoarginines de type (R-Ahx-R)₄, comportant une molécule d'acide 6-aminohexanoïque (Ahx), pour la correction d'épissage *in vivo* dans le cadre du traitement de la DMD par des PMO (Jearawiriyapaisarn et al. 2008; Lebleu et al. 2008; Abes, Moulton, et al. 2006).

Les CPP sont donc des molécules très intéressantes d'un point de vue thérapeutique, qui augmentent l'internalisation d'une grande variété de composés dans de nombreuses lignées cellulaires et avec une faible toxicité.

Chapitre III : Ciblage du récepteur à l'Insulin-like Growth Factor 1

Les récepteurs à tyrosines kinases (RTK) sont des protéines transmembranaires impliquées dans la communication intercellulaire qui contrôlent des processus cellulaires fondamentaux, tels que la croissance, la prolifération, la différenciation, la survie, la migration et le métabolisme. Ils comportent un domaine extracellulaire de fixation à un ou plusieurs ligands spécifiques, un domaine transmembranaire, et un domaine tyrosine kinase intracellulaire. La fixation spécifique d'un facteur de croissance sur le domaine extracellulaire, active le domaine tyrosine kinase par induction ou stabilisation de la dimérisation du récepteur. L'autophosphorylation des résidus tyrosine du domaine tyrosine kinase permet le recrutement de protéines adaptatrices et d'enzymes à la membrane, et l'assemblage d'une cascade de signalisation par activation de protéines effectrices. Ces événements de signalisation conduisent à l'activation de facteurs de transcription spécifiques, qui activent l'expression de gènes qui vont définir la réponse biologique associée au facteur de croissance impliqué dans l'initiation du signal.

L'axe IGF est constitué de deux récepteurs à tyrosines kinases, le récepteur à l'insuline (IR) et le récepteur à l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor-I Receptor, IGF1R), ainsi que du récepteur à l'IGF2 (IGF2R). L'activation de ces récepteurs implique trois ligands : IGF1, IGF2 et l'insuline, ainsi que six protéines de fixation à ces ligands appelées IGFBP (IGF Binding Proteins). Cet axe IGF a un rôle dans la croissance et le développement de nombreux tissus. Dans de nombreux cancers, il est impliqué dans la tumorigenèse, la croissance tumorale et la formation de métastases.

Dans ce chapitre seront décrits les principaux composants de la voie de signalisation associée à l'IGF1R et leurs rôles dans les cellules saines et tumorales, ainsi que les stratégies thérapeutiques de ciblage de ce récepteur en cancérologie.

III. 1. Le récepteur à l'IGF1

3. 1. Structure et fonction

a) IGF1R et l'axe IGF

Le gène *IGF1R* est localisé sur le chromosome 15 et code un polypeptide unique de 1367 acides-aminés qui est exprimé par presque tous les types cellulaires (Yuen & Macaulay 2008). L'IGF1R est un hétérotétramère constitué de deux chaînes α extracellulaires impliquées dans la reconnaissance et la fixation du ligand, et de deux chaînes β intracellulaires, comportant chacune un domaine transmembranaire et un domaine tyrosine kinase. Ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures (Figure 27).

Les ligands de l'IGF1R sont principalement les facteurs de croissance peptidiques IGF1 et IGF2. L'affinité du récepteur est plus forte pour l'IGF1 ($K_D = 1$ nM) que pour l'IGF2 ($K_D = 15-20$ nM). L'insuline fixe également l'IGF1R mais avec une affinité cent fois moindre ($K_D = 100$ nM) (Tognon & Sorensen 2012). L'IGF1 est produit principalement par le foie et sa production est contrôlée par l'hormone de croissance. Sa libération dans la circulation sanguine permet sa distribution dans de nombreux tissus, où il exerce son action endocrine. L'IGF2 est également exprimé dans le foie mais sa production n'est pas régulée par l'hormone de croissance. Principalement six IGFBP sont impliquées dans la régulation de l'axe IGF. Ces protéines ont une forte affinité pour IGF1 et IGF2 et, en se liant à ces ligands, régulent leur biodisponibilité par compétition avec la fixation au récepteur (Pollak 2008). De plus, ces IGFBP prolongent la demi-vie des IGF dans le sérum et les tissus, agissant ainsi comme des 'réservoirs' d'IGF. Ces IGFBP sont elles-mêmes régulées par des protéases spécifiques impliquées dans leur dégradation.

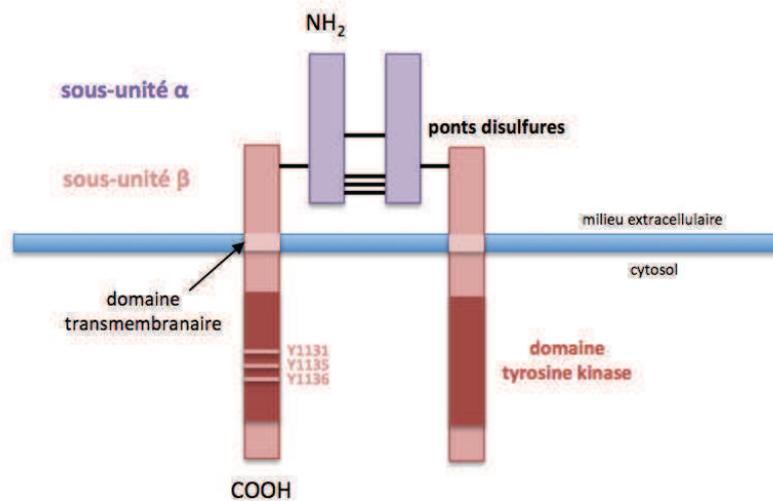


Figure 27 : Structure de l'IGF1R.

L'IGF1R est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités α et de deux sous-unités β , reliées par des ponts disulfures. Les sous-unités α comportent le domaine de fixation du ligand, et les sous-unités β sont constituées du domaine transmembranaire et du domaine intracytoplasmique tyrosine kinase. Ce domaine tyrosine kinase contient les tyrosines (Y1131, Y1135 et Y1136) de la boucle d'activation de la kinase, qui sont activées après fixation du ligand.

Le récepteur à l'IGF2 ne possède pas d'activité kinase. Il fixe l'IGF2 et régule sa biodisponibilité en l'internalisation, induisant ainsi sa dégradation lysosomale. Ceci a pour conséquence une diminution de la quantité d'IGF2 circulant pouvant activer l'IGF1R.

b) Voies de signalisation intracellulaires

La fixation du ligand sur l'IGF1R entraîne un changement conformationnel conduisant à l'activation des kinases des sous-unités β et à la transphosphorylation de tyrosines importantes (tyrosines 1131, 1135 et 1136). Ceci induit la phosphorylation de certains résidus tyrosines adjacentes et de sérines, qui sont alors reconnues par les protéines adaptatrices IRS 1-4 (Insulin Receptor Substrates 1-4) et Shc (Scr Homology 2 Containing) qui s'y fixent par leur domaine SH2 (Figure 28).

Les protéines Shc initient la voie des MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) par l'intermédiaire des protéines Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound protein 2) et SOS (Son Of Sevenless), un facteur d'échange nucléotidique de la guanine (Figure 28). Le recrutement de SOS permet l'activation de la petite GTPase Ras à la membrane, qui va activer la sérine kinase Raf, à l'origine de la voie Erk/MAPK (Extracellular-signal-regulated Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase). Cette voie de signalisation implique l'activation en série de la thréonine tyrosine kinase MEK1/2 (Mitogene-activated Extracellular signal Kinase) et

de la sérine thréonine kinase ErK1/2. Cette dernière est alors transloquée dans le noyau, où elle phosphoryle des facteurs de transcription impliqués dans l'activation de gènes associés à la prolifération cellulaire. Ces facteurs de transcription sont par exemple c-Fos, c-Myc, Pax6 (paired box 6), CREB (cAMP Response Element Binding Protein) et Stat3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) (Tognon & Sorensen 2012).

La sous-unité p85 de la protéine PI3 Kinase (PI3K) est également recrutée sur le domaine tyrosine kinase de l'IGF1R, ce qui va déclencher la voie PI3K/Akt (Figure 28). Cette sous-unité p85 peut également être recrutée sur les protéines adaptatrices IRS. La protéine PI3K est constituée de la sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110, qui catalyse la conversion du PIP₂ (Phosphatidyl-Inositol-diphosphate) en PIP₃ (Phosphatidyl-Inositol-triphosphate). Ceci conduit au recrutement de la protéine Pdk1 (serine/threonine Phosphoinositide-dependent Kinase 1), qui phosphoryle et active la protéine Akt (appelée aussi Protéine Kinase B). Cette protéine Akt activée contrôle de multiples voies de signalisation relatives à la croissance, à la survie cellulaire et au métabolisme. Les effets stimulateurs de la survie cellulaire résultent notamment de l'inhibition par la phosphorylation par Akt de la protéine Bad (B-cell lymphoma 2 Antagonist of cell Death), qui est un régulateur négatif des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) et Bcl-XL (B-cell lymphoma Like X). De plus, la phosphorylation de la protéine FoxO (Forkhead box 'other'), conduit à l'inhibition de l'apoptose par l'inhibition du facteur pro-apoptotique Bim (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death). La GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β) est également une cible de Akt. Sa phosphorylation conduit à la déphosphorylation et l'activation du facteur d'initiation de la traduction eIF2B, impliqué dans la synthèse protéique. L'activation d'Akt est également impliquée dans l'activation de la protéine mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1), conduisant à une augmentation de la synthèse protéique. Cet effet passe par le facteur d'initiation de la traduction eIF4E et par la kinase S6K (ribosomal S6).

Un rétrocontrôle négatif de l'activité de l'IGF1R est provoqué par l'activation d'Akt, qui peut également conduire à l'inhibition d'IRS1 par phosphorylation de sites inhibiteurs de cette protéine.

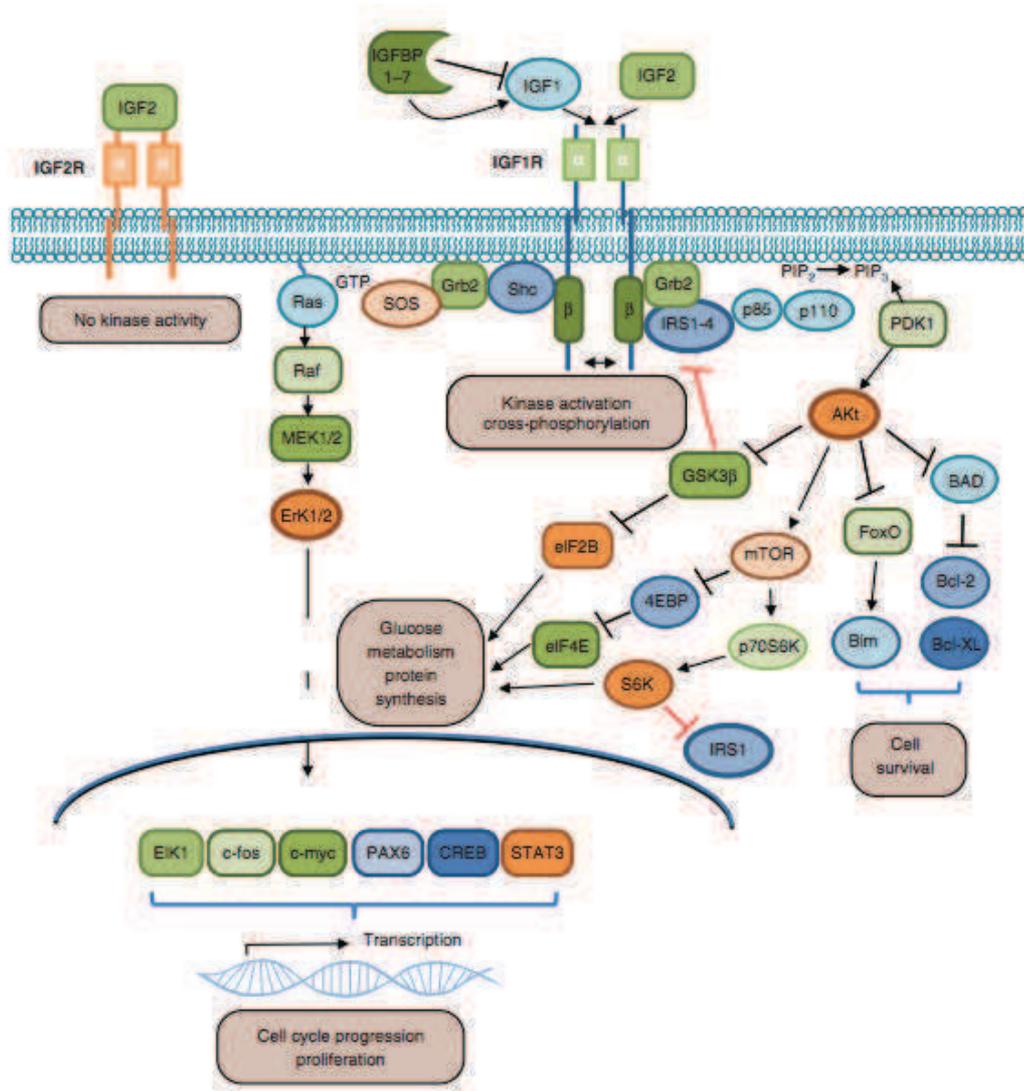


Figure 28 : Signalisation cellulaire associée à l'IGF1R (d'après Tognon et Sorensen 2012).
La fixation de l'IGF1 ou de l'IGF2 sur l'IGF1R induit des signaux de prolifération et survie cellulaires et stimule le métabolisme du glucose et la synthèse des protéines, par l'intermédiaire des voies de transduction ERK/MAPK et PI3K/Akt.

c) Fonctions biologiques

Le rôle de l'axe IGF dans la croissance et le développement a été mis en évidence par des études dans des modèles animaux KO pour les composants de cet axe. Des souris KO pour l'IGF1 présentent un poids à la naissance inférieur de 60% à celui des souris WT, associé à une forte mortalité périnatale. Des défauts de développement des muscles, os et poumons ont été observés chez ces souris KO (Powell-Braxton et al. 1993). Les mutants homozygotes pour l'*IGF1R* ont le phénotype le plus sévèrement affecté. Ces souris meurent toutes à la naissance de problèmes respiratoires, avec un déficit de croissance important (45%

de la taille des souris WT) et un développement anormal des muscles, des os, du système nerveux central et de l'épiderme (Liu et al. 1993). Ces études mettent en évidence l'importance de l'IGF1 et de l'IGF1R dans le développement embryonnaire chez la souris. Il n'existe pas de mutation homozygote de l'IGF1R connue chez l'homme. Cependant, un patient portant une délétion partielle du gène de l'IGF1, présente des défauts de développement et de croissance (Rother & Accili 2000; Camacho-Hübner et al. 2002).

Les fonctions physiologiques d'IGF1R sont de stimuler la croissance du corps, la myélinisation et la survie neuronale, ainsi que le développement mammaire et la lactation. Ce récepteur est également important pour la fonction rénale et la formation des os et influence la longévité (Hartog et al. 2007).

d) IGF1R et IR

IGF1R partage un fort degré de similitude avec le récepteur à l'insuline, leurs domaines tyrosine kinase étant conservés à 84%. L'identité totale entre les séquences protéiques entières est de 70%. Il existe deux isoformes de IR, générées par épissage alternatif de l'exon 11. L'isoforme A (IR-A) ne comporte pas l'exon 11 et est principalement exprimée dans les tissus fœtaux, où elle est impliquée dans la survie cellulaire en réponse à l'IGF2. L'isoforme B (IR-B) comporte l'exon 11 et est exprimée dans les tissus adultes, dans lesquels elle contrôle l'internalisation du glucose en réponse à l'insuline. Les deux isoformes possèdent des affinités similaires pour l'insuline mais l'IR-A possède une affinité environ dix fois supérieure à celle de l'IR-B pour l'IGF2. Du fait du fort degré d'homologie entre l'IR et l'IGF1R, des récepteurs hybrides peuvent se former, constitués d'une chaîne de l'IGF1R et d'une chaîne de l'IR. Des hybrides IGF1R/IR-A et IGF1R/IR-B ont été décrits. Les hybrides IGF1R/IR-A ont une affinité égale pour l'IGF2 et l'insuline, tandis que les hybrides IGF1R/IR-B ont une affinité supérieure pour l'IGF1 (Sachdev & Yee 2007), bien que l'affinité respective de ces récepteurs hybrides pour les différents ligands soit controversée.

IR et IGF1R ont évolué à partir d'un récepteur ancestral commun impliqué à la fois dans la régulation du métabolisme, et à la fois dans la croissance de l'organisme et la longévité. Bien qu'ayant conservé une séquence et une structure fortement similaires, ces récepteurs ont acquis des fonctions distinctes au cours de l'évolution.

3. 2. Implication dans le cancer

La signalisation de l'axe IGF est impliquée dans la formation et la progression des tumeurs, ainsi que dans la formation de métastases, dans une grande variété de cancers, comprenant le cancer du sein, de la prostate, du colon, du foie, du pancréas, des mélanomes, des myélomes, des glioblastomes... (Werner & Bruchim 2009; Sachdev & Yee 2007; Seccareccia & Brodt 2012). En effet, la surexpression et l'augmentation de l'activité tyrosine kinase de l'IGF1R sont fréquemment rencontrées dans de nombreux cancers (Resnik et al. 1998). Les taux des IGF sont également dérégulés dans certains cancers humains (Peyrat et al. 1993) et des études épidémiologiques ont montré que des forts taux d'IGF circulants sont associés à un risque augmenté de développer des cancers tels que le cancer du sein, de la prostate, du colon ou du poumon (Hankinson et al. 1998; Sachdev & Yee 2007).

(a) IGF1R et transformation cellulaire

L'importance de l'IGF1R pour la transformation oncogénique a été mise en évidence par des études montrant la dépendance de l'expression du récepteur pour la transformation de fibroblastes de souris par certains oncogènes, incluant l'antigène T du SV40 (Sell et al. 1993) et Ha-ras. De plus, il a été montré que la surexpression d'IGF1R conduit à la transformation de fibroblastes et à la formation de tumeurs *in vivo*, de manière dépendante de l'IGF1 (Kaleko et al. 1990). Les mécanismes responsables de cette dépendance de l'expression de l'IGF1R pour la transformation cellulaire restent en partie incompris.

(b) IGF1R et métastase

La signalisation de l'IGF1R a également un rôle critique dans la propension des tumeurs à former des métastases. Elle influence différents facteurs de la cascade métastatique, impliqués dans l'adhésion cellulaire, la migration, l'invasion, l'angiogenèse et la croissance des métastases dans les organes distants de la tumeur initiale (Werner & Bruchim 2009). L'expression de l'IGF1R et de sa principale molécule adaptatrice IRS-1, persiste dans les stades métastatiques (Hellawell et al. 2002). Plusieurs études ont montré que l'inhibition de l'IGF1R conduit à une réduction de la capacité à former des métastases (Prager et al. 1994; Dunn et al. 1998; Sachdev et al. 2004). De plus, les IGF peuvent stimuler la motilité cellulaire en stimulant l'interaction de certaines intégrines avec leurs ligands extracellulaires et modulent les interactions entre cellules *via* une signalisation croisée entre l'axe IGF et les molécules d'adhésion cellulaire comme la E-cadherine (Maile et al. 2002; Jackson et al. 2001;

André et al. 1999). Ces interactions peuvent influencer la propension des tumeurs à métastaser.

L'IGF1R est donc une cible pertinente pour les thérapies anticancéreuses. La première identification de ce récepteur en tant que cible thérapeutique a été réalisée il y a plus de vingt ans, avec l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'IGF1R, qui bloquait la prolifération de cellules de cancer du sein humaines (Arteaga & Osborne 1989). Depuis, de nombreuses approches ont été développées pour cibler spécifiquement l'IGF1R et ces approches ont montré une efficacité *in vivo* pour le traitement de nombreux cancers (Burfeind et al. 1996; Samani et al. 2004; Min et al. 2005).

3. 3. Stratégies de ciblage

Les approches de ciblage de l'IGF1R impliquent l'inhibition de l'expression ou de la fonction du récepteur par différents mécanismes. Les deux approches les plus avancées reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux contre l'IGF1R ou de petites molécules inhibitrices de tyrosines kinases. Elles ont permis le développement de molécules candidates aujourd'hui en essais cliniques. D'autres approches de ciblage de l'axe IGF dans les cancers ont été développées. L'ensemble de ces approches seront décrites dans ce paragraphe.

a) Anticorps monoclonaux

Les anticorps bloquants dirigés contre l'IGF1R empêchent l'activation du récepteur par le ligand, en créant une compétition avec le ligand pour la fixation au récepteur. La fixation de l'anticorps sur le récepteur conduit à l'internalisation cellulaire du complexe par endocytose et à sa dégradation. Par conséquent, la densité de récepteurs présents à la surface de la cellule est diminuée et la signalisation associée à l'IGF1R est abrogée. L'efficacité de cette approche a été démontrée en 1983 *in vitro* et sur des xénogreffes tumorales avec un anticorps monoclonal de souris (α -IR3) dirigé contre la sous-unité α de l'IGF1R (Kull et al. 1983). L'obtention de résultats prometteurs *in vitro* et chez la souris ont conduits au développement de plusieurs essais cliniques impliquant des anticorps monoclonaux, seuls ou en combinaison avec d'autres chimiothérapies. Par exemple, l'anticorps R1507, développé par Roche est en développement clinique de phase II pour le traitement de sarcomes (Pappo et

al. 2011). Une autre molécule, l'anticorps CP-751871 (Figitumumab), développé par Pfizer, est en essai clinique de phase II en combinaison avec le docetaxel pour le traitement du cancer du sein (<http://clinicaltrials.gov>). Il est à noter que deux essais cliniques de phase III (Pfizer) qui évaluaient les effets du Figitumumab en combinaison avec le paclitaxel et le carboplatine ou avec un inhibiteur de l'EGFR (Epidermal Growth Factor), ont été stoppés en 2010 pour des raisons de manque d'efficacité et de toxicité (Heidegger et al. 2011). Les effets toxiques observés, tels que l'hyperglycémie, pourraient résulter directement des fonctions physiologiques de l'IGF1R, et de sa signalisation croisée avec l'IR. La plupart des anticorps monoclonaux développés sont sélectifs de l'IGF1R et n'interfèrent pas avec l'IR. Cependant, ils pourraient interférer indirectement avec la signalisation de l'insuline *via* les récepteurs hybrides IGF1R/IR. Malgré leur potentiel, des progrès dans la connaissance et l'utilisation de ces anticorps monoclonaux pour cibler l'IGF1R sont donc attendus en terme d'efficacité et d'inocuité.

b) Inhibiteurs de tyrosines kinases

Les petites molécules inhibitrices des tyrosines kinases peuvent également cibler l'IGF1R. Elles agissent en empêchant l'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase du récepteur, inhibant la transmission intracellulaire du signal.

La plupart de ces inhibiteurs agissent par compétition avec la fixation de l'ATP sur le domaine tyrosine kinase. De cette manière, ils inhibent le changement conformationnel du domaine tyrosine kinase et son autophosphorylation. La conception d'inhibiteurs sélectifs de l'IGF1R est limitée par le haut degré de similarité entre l'IGF1R et l'IR. En effet, la poche de fixation de l'ATP de ces deux récepteurs est conservée à 100%. Toutefois, des variations subtiles dans les domaines tyrosines kinases peuvent être exploitées afin de générer des molécules sélectives pour l'IGF1R. Les premiers inhibiteurs de tyrosines kinases de l'IGF1R sont les composés NVP-AEW541 et NVP-ADW742, développés par Novartis, qui sont des dérivés de pyrrolo[2,3-d]pyrimidine. Ces molécules montrent une sélectivité pour l'IGF1R vis-à-vis de l'IR dans des tests cellulaires et sont associées à des effets anti-néoplasiques et anti-tumoraux *in vitro* et *in vivo* (García-Echeverría et al. 2004; Mitsiades et al. 2004; Yuen & Macaulay 2008). Aux concentrations employées pour l'inhibition de l'activité kinase, ces composés ne provoquent pas d'effets secondaires sur la glycémie, le poids ou le taux d'insuline.

Il existe également des inhibiteurs de tyrosines kinases de l'IGF1R non compétitifs de l'ATP, qui agissent en inhibant la phosphorylation de substrats par le domaine tyrosine kinase. Par exemple, le composé PPP, dérivé de la podophyllotoxine, inhibe la phosphorylation de la tyrosine Y1136 du domaine tyrosine kinase de l'IGF1R, conduisant à l'inhibition préférentielle de la voie PI3K-Akt, à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Vasilcanu et al. 2004). Le PPP montre une activité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo* dans différents modèles de cancers humains, tels que des myélomes, des sarcomes ou des mélanomes (Menu et al. 2006; Yuen & Macaulay 2008), sans effet sur l'IR. Cependant, la spécificité de cet inhibiteur pour l'IGF1R a été contestée (Linder et al. 2007). Le PPP fait l'objet d'un essai clinique de phase I/II (AXL1717, par Axelar AB), avec une administration par voie orale de la molécule, chez des patients atteints de carcinomes pulmonaires NSCLC (Non-small Cell Lung Cancer) (Ekman et al. 2011).

Plusieurs autres inhibiteurs de tyrosines kinases sont aujourd'hui en développement clinique, seuls ou en association avec d'autres chimiothérapies (Yee 2012). Ces inhibiteurs de tyrosines kinases montrent généralement de bonnes activités anti-tumorales mais, là encore, des effets secondaires indésirables ont été rapportés, principalement l'hyperglycémie. Ceci s'explique majoritairement par des problèmes de spécificité vis-à-vis de l'IR. Certaines études suggèrent que le co-ciblage de l'IR et de l'IGF1R (ainsi que des récepteurs hybrides) pourrait être bénéfique pour l'efficacité de traitement de certains cancers (Heidegger et al. 2011), l'IR étant également impliqué dans les cancers humains, notamment *via* un signal mitogénique délivré par l'IGF2 (Baserga 2013; Morrione et al. 1997; Frasca et al. 1999).

c) Inhibition de l'expression de l'IGF1R par stratégie antisens

Des oligonucléotides antisens peuvent être utilisés afin d'inhiber l'expression de l'IGF1R. De nombreuses études pré-cliniques ont montré que l'inhibition du récepteur conduit à l'inhibition de sa signalisation cellulaire et de la croissance des cellules tumorales et induit l'apoptose de ces cellules dans différents modèles de cancers (Werner & Bruchim 2009). Par exemple, un oligonucléotide gapmer PS/2'-MOE (développé par Antisense therapeutics sous le nom d'ATL1101) inhibe la croissance tumorale de xénogreffes cutanées chez la souris (Furukawa et al. 2010). La faisabilité de cette approche a été montrée chez l'homme, dans une étude avec un oligonucléotide PS 18 mer pour traiter *ex-vivo* des cellules gliales de patients d'astrocytomes malins (Andrews et al. 2001).

L'ARN interférence peut également être utilisée pour cette approche antisens. Un siARN ciblant l'IGF1R inhibe la signalisation de l'IGF1R, induit l'apoptose et augmente la sensibilité à certaines chimiothérapies dans des cellules de cancer de la prostate (Rochester et al. 2005). Un siARN comportant des modifications 2'-OMe dirigé contre l'IGF1R inhibe la prolifération de cellules de cancer du sein et retarde la croissance de tumeurs chez la souris. De plus, une réponse immune anti-tumorale peut se mettre en place (infiltration de lymphocytes et de leucocytes polynucléaires), et les cellules traitées sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (Tumor Necrosis Factor- α et interféron- γ) (Durfort et al. 2012; Schillaci et al. 2006).

L'avantage de cette stratégie thérapeutique repose sur sa spécificité, basée sur le choix de séquences cibles spécifiques de l'IGF1R et pas de l'IR. La limite actuelle est l'internalisation cellulaire des oligonucléotides antisens et la difficulté de développement d'une application par voie orale.

d) Protéines tronquées dominants négatifs de l'IGF1R

Une autre approche consiste à générer un récepteur IGF1R tronqué, dépourvu du domaine tyrosines kinases et par conséquent incapable d'être activé et de transmettre le signal intracellulaire. Ce récepteur tronqué conserve un site de fixation aux ligands intact et est donc capable de neutraliser leurs effets (Figure 29).

Cette stratégie a été appliquée pour la première fois à l'IGF1R en 1992, avec un récepteur comportant un codon STOP en position 952 de la séquence en acides aminés. Ce récepteur comporte toujours son domaine transmembranaire mais est dépourvu du domaine tyrosines kinases (Figure 29). Dans des cellules de rat, la surexpression du récepteur humain tronqué ⁹⁵²STOP bloque la signalisation associée à l'IGF1R en induisant la formation de récepteurs hybrides rat/humain non fonctionnels, agissant comme des dominants négatifs (Prager et al. 1992). La transfection de la sous-unité β de l'IGF1R tronquée à cette même position dans des fibroblastes de rat inhibe la tumorigénèse et la prolifération cellulaire, ainsi que la formation de tumeurs après injection des cellules transfectées à des souris athymiques (Prager et al. 1994). D'autres études avec ce même dominant négatif ont confirmé ces effets *in vivo* chez la souris athymique, avec une réduction de la tumorigénicité des cellules, mais aussi une induction de l'apoptose et une inhibition de la croissance des métastases (Jiang et al. 1999; Reinmuth et al. 2002). De manière similaire, des récepteurs dominants négatifs

tronqués en position 950, exprimés par des adénovirus recombinants induisent une inhibition de la signalisation associée à l'IGF1R et de la croissance cellulaire, ainsi que de la résistance à l'apoptose, dans des cellules humaines de cancer du poumon (Lee et al. 2003) de cancer gastrique (Min et al. 2005) et de cancer pancréatique (Min et al. 2003).

Des récepteurs tronqués dominants négatifs solubles ont également été décrits. Ces récepteurs ne comportent plus le domaine transmembranaire et sont par conséquent sécrétés par la cellule (Figure 29). Parmi ces récepteurs solubles, le dominant négatif ⁴⁸⁶STOP inhibe la transformation cellulaire et la croissance tumorale chez la souris athymique, dans cinq lignées cellulaires de cancers humains (carcinomes de prostate, colon, ovaires, poumons) (Reiss et al. 1998). Ce même dominant négatif inhibe la transformation *in vitro* et la métastase de cellules de cancer du sein chez la souris (Dunn et al. 1998). Ces deux études mettent en évidence un effet de ce dominant négatif soluble sur les cellules voisines, appelé 'effet *bystander*'. En effet, la croissance des tumeurs induites par les cellules cancéreuses sauvage est inhibée lors de la co-injection avec des cellules exprimant le dominant négatif. Il a également été montré que cette protéine ⁴⁸⁶STOP induit une apoptose massive de cellules de glioblastomes chez le rat (D'Ambrosio et al. 1996). Le dominant négatif IGF1R⁹³³ est constitué de la totalité du domaine extracellulaire de l'IGF1R. Chez la souris, l'injection de cellules murines de carcinome du poumon exprimant ce dominant négatif inhibe la formation et la croissance de tumeurs, ainsi que la formation de métastase hépatiques et la survie des souris (Samani et al. 2004). Le dominant négatif ⁴⁸²STOP est également soluble et l'injection d'adénovirus recombinants exprimant ce récepteur tronqué inhibe la formation de tumeurs ainsi que la croissance et les métastases de tumeurs préexistantes chez la souris. De plus, l'injection intratumorale de ces adénovirus sensibilise la tumeur à certaines chimiothérapies telles que le 5-fluorouracile (Min et al. 2005; Min et al. 2003). Chez la souris, l'injection *in vivo* de virus AAV exprimant une forme soluble de l'IGF1R conduit à la production de ce dominant négatif dans le plasma et à l'inhibition de métastases du foie (Wang et al. 2013).

Malgré ces résultats prometteurs, la limite de cette approche repose sur la vectorisation du gène exprimant le dominant négatif. Le caractère immunogène des adénovirus rend leur utilisation difficilement transposable à l'homme.

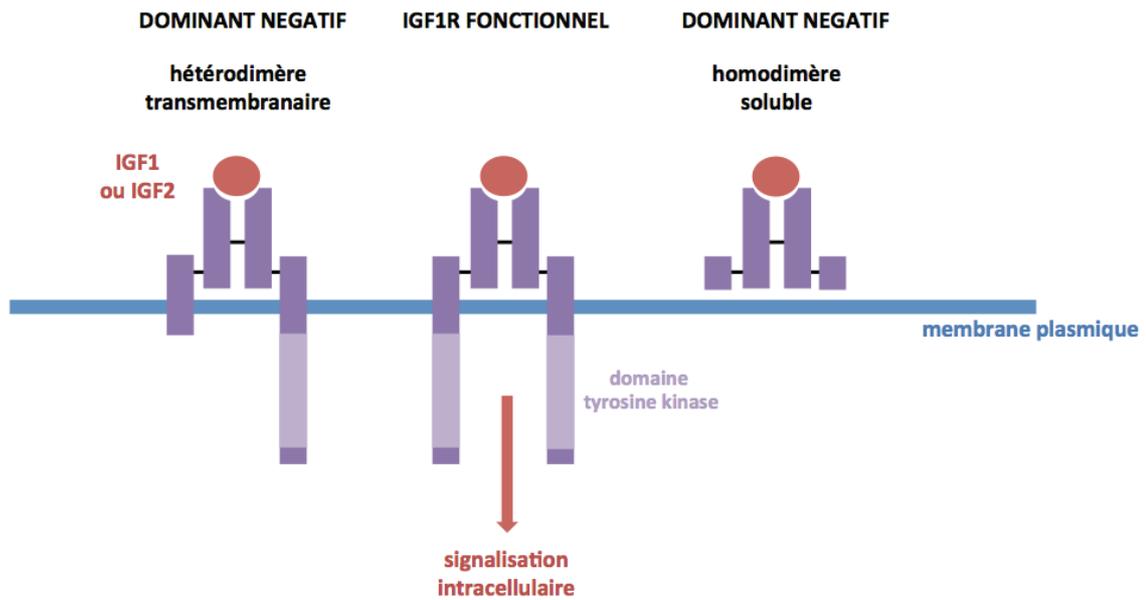


Figure 29 : Protéines tronquées dominants négatifs de l'IGF1R décrites dans la littérature.

e) Autres approches

D'autres stratégies de ciblage de l'axe IGF ont été plus récemment développées. Parmi ces approches, la neutralisation des IGF a pour conséquence l'inhibition de l'activation des récepteurs et de la signalisation intracellulaire. Pour la neutralisation de ces ligands, des anticorps anti-IGF1 ou IGF2 peuvent être utilisés. L'anticorps monoclonal de rat KM1468 se fixe à la fois à l'IGF1 et l'IGF2 et inhibe les métastases osseuses de cellules de cancer de la prostate chez la souris (Goya et al. 2004). Les IGFBP sont des molécules naturellement impliquées dans la régulation de la biodisponibilité des IGF. Il a été montré que la présence en excès de ces molécules peut inhiber la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, IGFBP-1 inhibe la croissance induite par l'IGF1 de cellules de cancer du sein en bloquant l'interaction entre l'IGF1 et son récepteur. L'inhibition de l'activation du récepteur induite par IGFBP-1 conduit l'inhibition de la prolifération de ces cellules, ainsi que de leur croissance en absence d'ancrage (Sachdev & Yee 2007). L'administration d'IGFBP-1 recombinant à des souris, inhibe la croissance tumorale de xénogreffes de cancer du sein (Van den Berg et al. 1997). Par ailleurs, certaines IGFBP telles que IGFBP3 peuvent exercer une activité antitumorale indépendamment des IGF (Oh 1998). N'ayant pas d'effet sur l'IR et la signalisation de l'insuline, cette stratégie semble intéressante en terme de toxicité. Cependant, des progrès sont attendus pour augmenter la stabilité de ces IGFBP pour leur utilisation *in vivo* (Van den Berg et al. 1997).

Une autre stratégie ciblant l'IGF1 consiste à réduire sa synthèse en utilisant des antagonistes de l'hormone de croissance, responsable de la synthèse hépatique d'IGF1.

Enfin, une stratégie consiste à inhiber l'expression de l'IGF1 ou de l'IGF1R au niveau de la transcription. Une étude utilise des oligonucléotides formant une triple hélice sur l'ADN, couplés à un inhibiteur de topoisomérase, la camptothécine, pour induire une coupure ciblée de l'ADN et inhiber l'expression de l'IGF1 et de l'IGF1R (Oussedik et al. 2010).

III. 2. Inhibition de l'élongation de la traduction de l'IGF1R pour générer une protéine tronquée dominant négatif

La stratégie développée dans notre équipe consiste à utiliser des PNA riches en pyrimidines pour inhiber l'élongation de la traduction et générer des protéines tronquées aux mêmes positions que pour les dominants négatifs déjà décrits de l'IGF1R (voir page 99). Générer ces protéines tronquées dominants négatifs par inhibition de la traduction de l'IGF1R humain permet une action directe sur le gène endogène plutôt que l'apport d'une protéine dominant négatif exogène. Ceci permettrait de s'affranchir de l'utilisation de virus pour exprimer la protéine tronquée à partir de plasmides comportant un codon STOP. Dans le cadre de sa thèse, Sabine Lecosnier (école doctorale MTCE, soutenance en décembre 2010) a réalisé un criblage *in vitro* de huit séquences de PNA 17-mer riches en pyrimidines, dirigées contre la séquence codante d'IGF1R à différentes positions. Il résulte de ce criblage que seuls deux PNA, comportant un large bloc central pyrimidique riche en thymine, et donc pouvant former des triplexes partiels, sont capables d'inhiber l'élongation de la traduction *in vitro* en générant une protéine tronquée. Parmi ces PNA, seul le PNA 959 (séquence TTATTTCTCTTTCTATG) a montré une activité cellulaire. En effet, ce PNA inhibe la traduction de la sous-unité β de l'IGF1R dans des cellules DU145 de cancer de la prostate surexprimant IGF1R. Il a de plus été montré que cette inhibition est spécifique et sélective de l'IGF1R vis-à-vis de l'IR, ce dernier n'étant pas inhibé lorsque l'IGF1R est inhibé. Les conséquences fonctionnelles de cette inhibition de l'IGF1R dans les cellules DU145 sont l'inhibition des voies de signalisation Akt et ERK associées au récepteur ainsi que l'inhibition du potentiel clonogénique des cellules en soft agar. Ces travaux ont donné lieu à la publication suivante : A steric blocker of translation elongation inhibits IGF-1R expression and cell transformation, figurant en Annexe 1.

Chapitre IV : Projet de thèse

Les conditions requises pour qu'un oligonucléotide bloqueur stérique soit efficace pour inhiber l'élongation de la traduction ne sont pas encore complètement comprises, même si la nécessité de formation d'une structure de type triplexe entre l'oligonucléotide et l'ARN existe dans la majorité des cas (Knudsen & Nielsen 1996; Lecosnier et al. 2011). Les questions qui persistent concernent notamment la taille minimale et la composition en bases de l'oligonucléotide et la nature des modifications chimiques le constituant, permettant le blocage stérique de l'élongation de la traduction. De plus, l'étude de Lecosnier et al. a montré pour la première fois que la transfection de cellules par un PNA dirigé contre la partie codante de l'ARNm de l'IGF1R inhibe sa traduction sans provoquer sa dégradation (Lecosnier et al. 2011). Cependant, si une protéine tronquée est générée *in vitro* suite à l'arrêt de la machinerie ribosomale par le PNA, aucune mise en évidence de l'expression d'une telle protéine tronquée n'a été réalisée *in cellulo*. L'expression de la protéine tronquée dans les cellules serait la preuve la plus directe d'un mécanisme impliquant l'inhibition de l'élongation de la traduction par le PNA et l'adressage de cette protéine tronquée à la membrane plasmique constituerait l'accomplissement complet de la stratégie visant à générer des dominants négatifs de l'IGF1R.

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à la comparaison de l'activité d'arrêt de l'élongation de la traduction par les PNA, à celle d'autres bloqueurs stériques (PMO et LNA), *in vitro* et dans des cellules perméabilisées. Nous avons également recherché l'expression d'une protéine tronquée résultant d'un blocage stérique par des PNA dirigés contre la séquence codante de l'intégrase du VIH. Enfin, nous nous sommes intéressés à la relation entre la taille des PNA et leur activité, en raccourcissant en N-terminal et C-terminal, la séquence du PNA 17-mer dirigé contre l'IGF1R et sélectionné par Lecosnier et al. Cette étude a été réalisée pour mieux comprendre l'importance des bases du PNA dans la formation d'un triplexe qui arrête l'élongation de la traduction.

La seconde partie de ce travail a été consacrée à l'internalisation cellulaire des PNA. Ceux-ci étant des oligonucléotides neutres, les lipides et polymères cationiques ne peuvent être utilisés pour améliorer leur internalisation cellulaire, sauf lorsqu'ils sont co-transfectés avec un ADN complémentaire (Koppelhus & Nielsen 2003; Hamilton et al. 1999; Doyle et al. 2001). Néanmoins, la méthode la plus utilisée repose sur l'utilisation des CPP et de nombreux CPP ont été décrits pour promouvoir l'internalisation cellulaire des PNA. Les CPP riches en

arginines sont très efficacement internalisés dans les cellules, en comparaison aux autres CPP cationiques (Mitchell et al. 2000). Le CPP (R/W)9 est un peptide amphipathique constitué de six arginines et de trois tryptophanes (RRWWRRWRR), qui est un analogue plus court du peptide (R/W)16 (RRWRRWWRRWWRRWRR), dérivé de la pénétratine (Derossi et al. 1998). (R/W)9 fait partie des peptides les plus efficacement internalisés parmi les CPP riches en arginines (Aubry et al. 2010) et il a été montré que son internalisation cellulaire atteint un maximum en 30-60 min, en l'absence de cytotoxicité jusqu'à 48 heures d'incubation et d'exocytose jusqu'à 18h (Delaroche et al. 2007). De plus, (R/W)9 internalise le peptide inhibiteur de la protéine kinase C (PKCi) quand il est conjugué à ce dernier par pont disulfure (Delaroche et al. 2007). Notre objectif a été d'étudier l'internalisation cellulaire et l'activité biologique de PNA conjugués à (R/W)9 par un pont disulfure. Le pont disulfure est considéré comme une liaison stable dans le milieu extracellulaire mais réductible dans le milieu intracellulaire, conduisant à la libération des deux entités (Saito et al. 2003). Ce type de liaison est potentiellement impliqué dans des échanges avec des thiols membranaires, pouvant moduler l'efficacité d'internalisation cellulaire (Aubry et al. 2009; Torres et al. 2011). Afin d'étudier l'impact de cette liaison sur l'efficacité d'internalisation et sur l'activité biologique des conjugués, nous avons comparé l'efficacité de ce type de conjugués avec des conjugués formés par une liaison non clivable (maléimide). L'importance des tryptophanes pour l'interaction avec la membrane et l'internalisation cellulaire du CPP (R/W)9 a déjà été montrée (Walrant et al. 2011; Walrant et al. 2012). Nous nous sommes intéressés au rôle des arginines en comparant l'internalisation des conjugués (R/W)9 avec celle de conjugués (K/W)9, comportant des lysines à la place des arginines. L'étude des mécanismes impliqués dans l'internalisation cellulaire de ces conjugués nous a conduit également à nous intéresser à une stratégie d'internalisation photochimique pour augmenter la quantité de conjugué accessible dans le cytoplasme. Nous avons étudié l'efficacité de la tétraméthylrhodamine (TAMRA) comme agent photosensibilisateur, dans le but de développer un conjugué trifonctionnel constitué du PNA pour l'activité biologique, du CPP pour l'internalisation cellulaire, et d'un groupement photosensible pour l'adressage au cytoplasme.

Résultats

- Chapitre I Inhibition de la traduction par des oligonucléotides
 bloqueurs stériques
- Chapitre II Internalisation cellulaire des PNA

Chapitre I : Inhibition de la traduction par des oligonucléotides bloqueurs stériques

I. 1. Comparaison de différentes modifications chimiques de bloqueurs stériques *in vitro* et *in cellulo*

Nous avons comparé l'activité d'inhibition de la traduction par les PNA à celle d'autres bloqueurs stériques, les LNA et les PMO. Tout comme les PNA, ces molécules ne recrutent pas la RNase H et agissent par blocage stérique.

Les LNA sont des molécules analogues de l'ARN qui possèdent un pont méthylène connectant l'oxygène 2' du ribose avec le carbone 4' (Figure 30). Ce pont réduit la flexibilité conformationnelle du sucre et augmente la pré-organisation locale du squelette. Les LNA sont les oligonucléotides les plus affins vis-à-vis de l'ARN, avec une T_m pouvant être augmentée jusqu'à 9,6°C par nucléotide LNA. Du fait de leur très forte affinité pour les acides nucléiques, les oligonucléotides LNA possèdent généralement une unité LNA sur deux, les autres nucléotides étant de chimie phosphodiester classique. Ces molécules sont chargées négativement, ce qui permet de les délivrer dans les cellules selon un protocole standard de transfection utilisant les lipides cationiques.

Les PMO sont des analogues non ioniques de l'ADN, dans lesquels les riboses ont été remplacés par des cycles morpholines, liés entre eux par des groupements phosphorodiamidates au lieu de groupements phosphates (Figure 30). Leur affinité vis-à-vis des ARN est similaire à celle d'un oligonucléotide ADN de même séquence, et donc inférieure à celle de la plupart des autres oligonucléotides modifiés de troisième génération. C'est pourquoi les PMO sont généralement commercialisés avec une taille minimale de 25 bases.

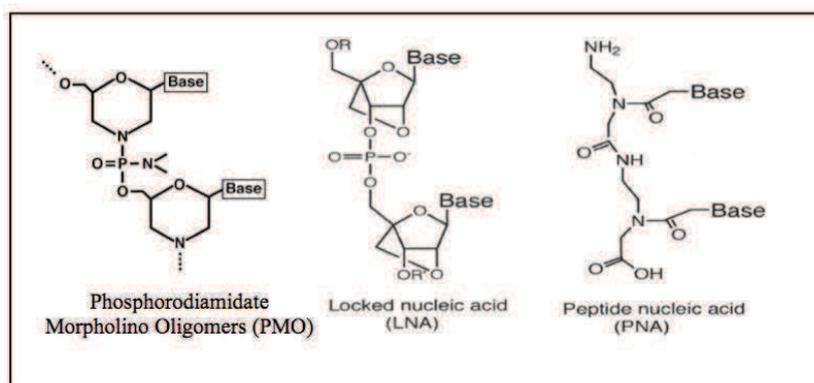


Figure 30 : Structure chimique des PMO, LNA et PNA.

1. 1. Système d'étude : la séquence Polypurine Tract (PPT) de l'intégrase du VIH

La séquence polypurine Tract (PPT) est une séquence polypurique A₄GA₄G₆A conservée dans toutes les souches du VIH-1 et présente dans la région codante des transcrits des gènes *nef* et intégrase du VIH-1 (Figure 31). Cette séquence riche en G est très structurée *in vitro*, principalement par la formation de structures secondaires de quadruplexes de guanines (Boutimah-Hamoudi et al. 2007).

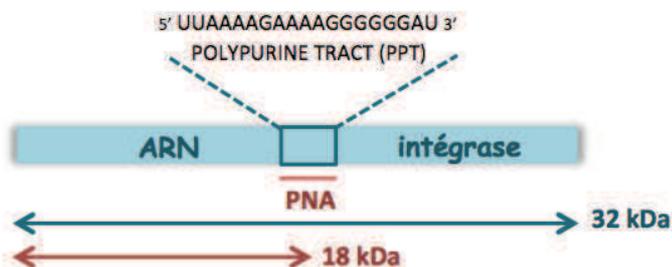


Figure 31 : Représentation schématique de l'ARNm de l'intégrase de HIV-1 et position de la séquence PPT.

La séquence PPT est située en position 571 de l'ARNm de l'intégrase (environ 900 nucléotides au total). La traduction complète génère une protéine de 32 kDa, tandis que la protéine tronquée au niveau de la séquence PPT a un poids moléculaire de 18 kDa.

1. 2. Activité biologique d'oligonucléotides dirigés contre la séquence PPT

a) Inhibition de l'élongation de la traduction *in vitro*

Le PNA AS1 (ou 13mer-I, de séquence C₄T₄CT₄) et le PNA AS2 (ou 13mer-II, de séquence TC₆T₄CT) sont des PNA polypyrimidiques dirigés contre la séquence PPT. Il a été montré que ces deux PNA 13-mer riches en thymines sont capables d'envahir l'ARN PPT structuré et d'inhiber l'élongation de la traduction de l'intégrase *in vitro* (Boutimah-Hamoudi et al. 2007). Cet arrêt de la traduction entraîne une inhibition de la synthèse de l'intégrase entière (32 kDa) en faveur de la production d'une protéine tronquée de 18 kDa (Figure 32).

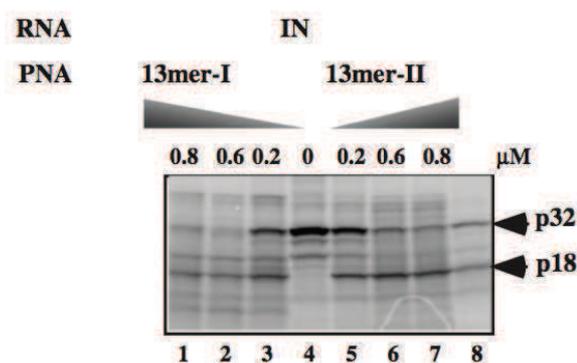


Figure 32 : Inhibition de l'élongation de la traduction de l'intégrase *in vitro* par les PNA 13mer AS1 et AS2 (d'après Boutimah et al. 2007).

L'ARNm de l'intégrase est transcrit *in vitro* à partir d'un plasmide exprimant l'ADNc de l'intégrase à partir d'un promoteur SP6. Ces transcrits sont ensuite traduits dans du lysat de réticulocytes de lapin en présence de méthionine ³⁵S. Les protéines nouvellement synthétisées sont donc marquées radioactivement et peuvent être détectées après migration sur gel SDS PAGE et autoradiographie. La fixation des PNA sur la séquence PPT de l'intégrase entraîne un arrêt de l'élongation de la traduction de la protéine entière (p32) de 32 kDa et génère une protéine tronquée (p18) de 18 kDa.

Nous avons comparé les activités *in vitro* d'un LNA, d'un PMO et d'un PNA isoséquentiels 18-mer dirigés contre la séquence PPT et dont la séquence (TCCCCCCTTTTCTTTTAA) englobe celle des PNA 13-mer. Les séquences des oligonucléotides 13-mer et 18-mer sont indiquées dans le Tableau 2.

Nom	Séquence (5' vers 3')	Taille (bases)
AS1	CCCCTTTTCTTTT	13
AS2	TCCCCCCTTTTCT	13
PNA/PMO/LNA18	TCCCCCCTTTTCTTTTAA	18

Tableau 2 : Séquences des oligonucléotides 13-mer et 18-mer dirigés contre la séquence PPT.

Des expériences de traduction *in vitro* ont été réalisées à partir des transcrits de l'intégrase, en présence du PNA et du LNA 18-mer, et des PNA 13-mer AS1 et AS2, dont l'efficacité a déjà été démontrée (Boutimah-Hamoudi et al. 2007) (Figure 33). Ces expériences consistent tout d'abord en une étape de transcription *in vitro*, à partir d'un plasmide exprimant le gène de l'intégrase (pRP159-IN) en aval d'un promoteur SP6 de phage. Les transcrits sont ensuite purifiés afin d'éliminer la polymérase et les ribonucléotides non incorporés. Ceci est suivi d'une traduction *in vitro* de ces transcrits dans du lysat de réticulocyte de lapin en présence d'acides aminés, de méthionine ³⁵S et de PNA AS1 ou AS2 pendant 20 min à 37°C. Le lysat de réticulocyte de lapin est un système acellulaire de traduction contenant tous les facteurs nécessaires pour la traduction (ribosomes, facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison, ARN de transfert...). Les protéines nouvellement synthétisées sont donc radiomarquées et sont détectées après migration sur gel SDS-PAGE et autoradiographie.

Cette expérience a montré que le PNA 18-mer est aussi efficace que le PNA 13-mer AS1 pour bloquer l'élongation de la traduction et générer la protéine tronquée (18 kDa) dès 0,3 µM (Figure 33). En revanche, le LNA 18-mer est inactif même à 5 µM. On peut supposer que les LNA se fixent sur leur cible mais qu'ils sont dissociés lors du passage des ribosomes. De plus, la très forte affinité des LNA pourrait augmenter leur fixation sur des sites secondaires, non spécifiques.

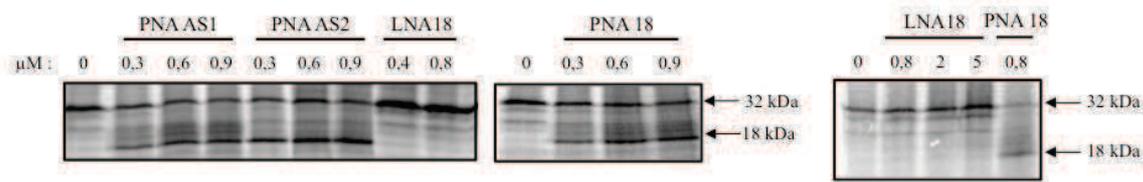


Figure 33 : Inhibition de la traduction de l’intégrase *in vitro* par les PNA 13-mer (AS1 et AS2), PNA-18 mer (PNA18) et LNA 18-mer (LNA18).

La traduction de l’intégrase est réalisée *in vitro* dans le lysat de réticulocytes de lapin, en présence des différents oligonucléotides aux concentrations indiquées. Les protéines néosynthétisées en présence de méthionine ³⁵S sont migrées sur un gel SDS-PAGE 14%. La radioactivité est révélée par autoradiographie. La protéine entière a un poids moléculaire de 32 kDa, la protéine tronquée générée par l’arrêt de la machinerie ribosomale a un poids moléculaire de 18 kDa.

b) Inhibition de l’initiation de la traduction dans les cellules HeLa

L’efficacité cellulaire des oligonucléotides dirigés contre la séquence PPT pour inhiber l’initiation de la traduction peut être déterminée dans un système cellulaire rapporteur dans lequel la séquence PPT ou une séquence PPT mutée a été introduite en amont des gènes luciférase (*luc*) de *Photinus pyralis* et *gfp*, respectivement (Figure 34). Ces gènes rapporteurs sont exprimés à partir d’un promoteur CMV bidirectionnel inductible à la doxycycline. Les cellules HeLa 1002 ont intégré stablement cette construction et permettent d’étudier l’activité biologique des PNA dirigés contre la séquence PPT par mesure de l’activité luciférase.

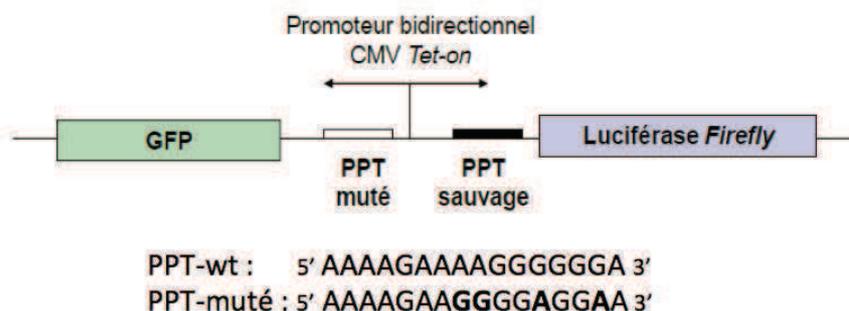


Figure 34 : Construction intégrée stablement dans les cellules HeLa 1002

La séquence PPT ou PPT mutée est située entre le promoteur et le codon d'initiation du gène rapporteur correspondant, c'est-à-dire dans le 5'UTR de l'ARNm. Par conséquent, la fixation d'un PNA sur cette séquence PPT ou PPT mutée entrera en compétition avec la fixation des ribosomes ou d'autres facteurs nécessaires à l'initiation de la traduction sur l'ARNm et provoquera l'inhibition de l'expression du gène rapporteur. La séquence PPT mutée comporte quatre mutations par rapport à la séquence sauvage (Figure 34), générant trois mésappariements avec le PNA AS1 et quatre avec le PNA AS2 (Figure 35). Ainsi, une activité efficace et spécifique des PNA sera caractérisée par une hybridation des PNA uniquement sur la séquence PPT sauvage et donc par une inhibition de l'expression de la luciférase, sans inhibition de l'expression de la GFP.



Figure 35 : Fixation des PNA AS1 et AS2 sur la séquence PPT mutée contenue dans la construction des cellules HeLa 1002.

La fixation du PNA AS1 est affectée par la présence de 3 mésappariements avec la séquence PPT mutée, tandis que la fixation du PNA AS2 est affectée par 4 mésappariements.

En l'absence de transporteur, les PNA ne sont pas internalisés dans les cellules. Pour s'affranchir de ce problème, les PNA ont été introduits directement dans les cellules par perméabilisation de la membrane par la SLO. Pour cela, les cellules ont été incubées en présence de PNA et de SLO pendant 15 min, puis du milieu frais est ajoutée pour l'obturation des pores. L'expression des gènes rapporteur est induite par ajout de milieu contenant de la doxycycline et les cellules sont cultivées pendant 24h ou 43h supplémentaires. L'activité luciférase, la GFP et la quantité de protéines totales sont ensuite mesurées à partir des lysats cellulaires. L'activité luciférase et l'expression de la GFP sont normalisées par rapport à la quantité de protéines, qui reflète le nombre de cellules dans chaque puits. L'activité luciférase (RLU/ μ g de protéines) et l'expression de la GFP (GFP/ μ g de protéines) sont exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs obtenues pour les cellules non traitées (cellules perméabilisées par la SLO en absence de PNA). La Figure 36 représente les résultats obtenus

par Boutimah et al. après transfection des cellules par le PNA AS1, AS2, ou un PNA contrôle, dit *scramble*. Une inhibition dose-dépendante de l'activité luciférase est observée pour les PNA AS1 et AS2, avec jusqu'à 70% d'inhibition à 1 μM . Le PNA contrôle de séquence n'inhibe pas l'activité luciférase. L'expression de la GFP n'est pas affectée en présence des PNA, témoignant de la spécificité de leur activité.

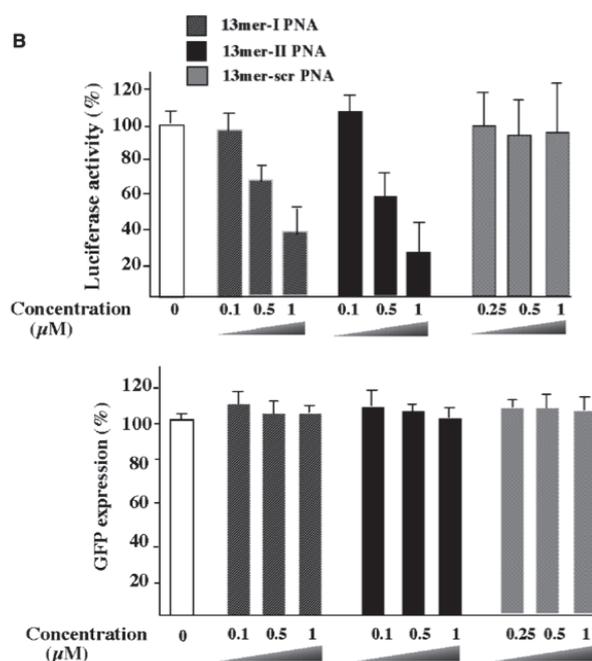


Figure 36 : Activité luciférase et expression de la GFP dans les cellules HeLa perméabilisées.

Après perméabilisation par la SLO en présence de PNA AS1 (13mer-I), AS2 (13mer-II) ou d'un PNA scramble (13mer-scr), aux concentrations indiquées, les cellules sont lysées et l'activité luciférase (en haut) et la fluorescence de la GFP (en bas) sont mesurées (d'après Boutimah et al. 2007).

Les oligonucléotides PMO, LNA et PNA 18-mer ont été testés à 1 μM dans les cellules HeLa 1002 perméabilisées à la SLO (Figure 37) et aucune activité intracellulaire n'a été observée avec ces oligonucléotides, en comparaison aux PNA AS1 et AS2 et à un PNA *scramble* contrôle 13-mer scr2 (TTTTCTCTCCCT).

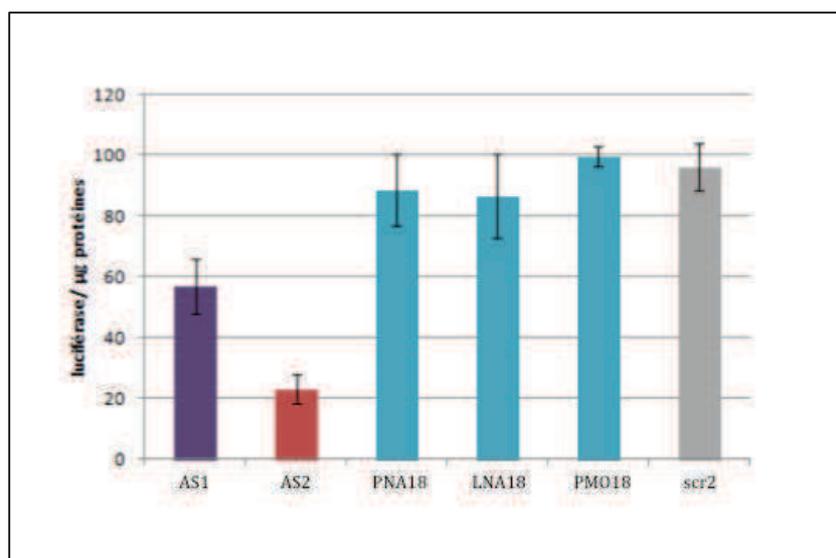


Figure 37 : Inhibition de la traduction par les PNA 13-mer (AS1, AS2 et scr2), PNA-18 mer (PNA18), LNA 18-mer (LNA18) et PMO 18-mer (PMO18).

Les cellules HeLa 1002 ont été perméabilisées par la SLO en présence des différents oligonucléotides à 1 μM . L'activité luciférase est révélée 24 heures après induction de l'expression par la doxycycline et les résultats sont exprimés en % d'activité luciférase/ μg de protéines, par rapport aux valeurs obtenues pour les cellules non traitées.

1. 3. Etudes des complexes formés *in vitro* avec l'ARN complémentaire

Des expériences de gel retard (EMSA) et de dénaturation thermique ont permis de caractériser les complexes formés *in vitro* par les PNA 13-mer sur l'ARN cible. Il a ainsi été montré que le PNA AS1, plus riche en T, forme une structure de type triplexe partiel alors que le PNA AS2, plus riche en C, se comporte différemment en ce qui concerne l'absence d'hystérésis dans les expériences de dénaturation thermique (Boutimah-Hamoudi et al. 2007). Néanmoins, le PNA AS2 est capable d'inhiber l'élongation de la traduction *in vitro* avec une efficacité légèrement supérieure à celle de l'AS1 ($\text{IC}_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ contre $0,3 \mu\text{M}$ pour l'AS1).

Pour tenter d'expliquer la différence d'efficacité entre les PNA, LNA et PMO 18-mer, des expériences de retard sur gel avec l'ARN complémentaire 19-mer (séquence UUAAAAGAAAAGGGGGGAU) radiomarqué ont été réalisées (Figures 38-40). Nous avons tout d'abord étudié la fixation des PNA 13-mer AS1 et AS2 sur l'ARN PPT WT pour évaluer leur capacité à envahir la séquence PPT, cible très structurée, par retards de migration sur gel de polyacrylamide (EMSA). L'ARN cible PPT WT19 mer radiomarqué au ^{32}P en 5' est incubé en présence de concentrations croissantes en PNA, et déposé sur gel natif de

polyacrylamide. La Figure 38 montre que l'ARN 19-mer seul (gel de gauche, point 0) migre sous deux formes : ARN déplié (bande ayant le plus migré) et ARN structuré (bandes majoritaires ayant le moins migré). Ces structures de l'ARN sont dues aux six guanines contiguës de la séquence et il a été montré que de telles séquences sont impliquées dans la formation de quadruplexes de guanines, intramoléculaires et intermoléculaires (Lyonnais et al. 2002; Lyonnais et al. 2003). En effet, quand on interrompt cette séquence de six guanines en introduisant deux adénines (ARN mut, séquence AUAAAAGAAAAAGGAGGAU), l'ARN migre au même niveau que l'ARN wt déplié (Figure 38, 0 et 0mut). A faibles concentrations (< 25 nM), les PNA AS1 et AS2 forment avec la cible ARN wt des complexes (complexes 1) qui migrent plus lentement que l'ARN structuré, alors qu'à des concentrations plus fortes, un complexe migrant plus rapidement que l'ARN devient prédominant (complexe 2 ou complexe 3). Une hypothèse pour ces complexes est que C1 correspond à la fixation des PNA sur la partie de l'ARN riche en A, qui n'est pas structurée. Les complexes 2 et 3 correspondraient à l'invasion de la structure riche en G par les PNA (complexe 'ouvert'), ces derniers formant avec l'ARN un duplexe (complexe 2) ou un triplex (complexe 3) (Figure 40). Les complexes formés entre le PNA AS1 et l'ARN muté migrent au même niveau que les complexes 2 et 3 (Figure 38). Le PNA AS2, qui peut former 6 paires GC avec l'ARN non muté ouvre la structure légèrement plus efficacement que le PNA AS1, qui ne peut former que 4 paires GC (Figure 16 et (Boutimah-Hamoudi et al. 2007)).

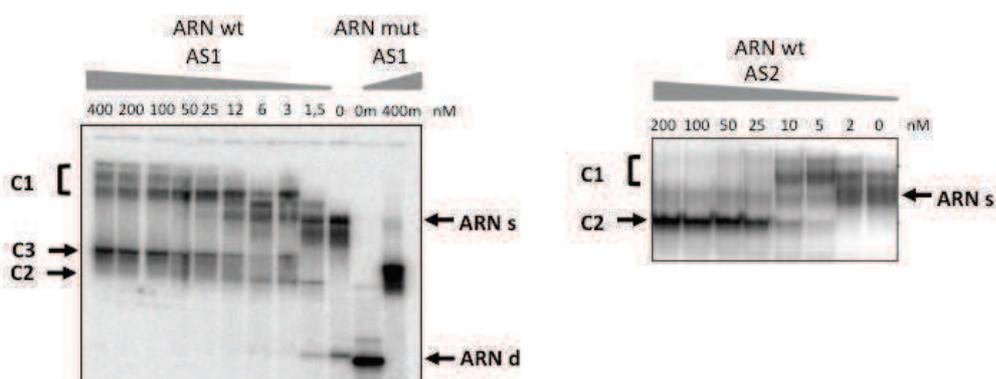


Figure 38 : Retards de migration sur gel de polyacrylamide des complexes formés entre l'ARN 19-mer et les PNA AS1 et AS2 (d'après Boutimah et al. 2007).

Les complexes formés en tampon Tris 50 mM entre l'ARN muté (ARN mut) ou non muté (ARN wt) (2 nM) et des concentrations croissantes de PNA AS1 (gel de gauche) ou AS2 (gel de droite) sont migrés sur gel de polyacrylamide 15%. C1 = complexes 1 ; C2 = complexe 2 ; C3 = complexe 3 ; ARN s = ARN structuré ; ARN d = ARN déplié

La Figure 39 représente les mêmes expériences avec les oligonucléotides 18-mer. Le PNA 18-mer forme beaucoup de complexes 1 mais peu de complexes 2 et 3 et ne parvient donc pas à déstructurer l'ARN aussi bien que les PNA 13-mer, dans la même gamme de concentrations étudiée. Le LNA et le PMO 18-mer entrent en compétition avec la formation de structures d'ARN, comme l'atteste la disparition totale de l'ARN libre au profit du complexe 2 à une concentration de 100 nM en LNA et de 800 nM en PMO. En revanche, aucun complexe 3 n'est détecté pour ces deux oligonucléotides.

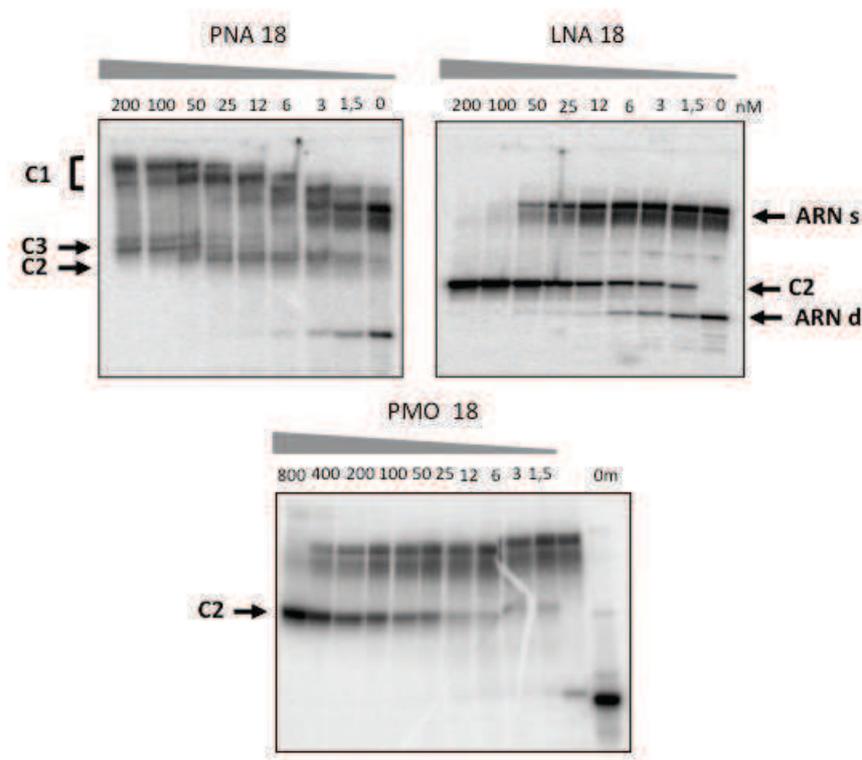


Figure 39 : Retard de migration sur gel d'acrylamide 15% des complexes formés entre l'ARN sauvage 19 mer radiomarqué (2 nM) et le PNA18, le LNA 18 ou le PMO 18.

C1 = complexes 1 ; C2 = complexe 2 ; C3 = complexe 3



Figure 40 : Représentation schématique des ARN PPT WT (ARN WT) et muté (ARN mut) et des complexes formés avec le PNA AS1.

L’encadré rouge sur l’ARN WT correspond aux six guanines contigues, engagées dans des interactions entre guanines formant des quadruplexes de guanines en intra ou en intermoléculaire. Le PNA AS1 est représenté en violet. Les complexes C1 correspondent à la fixation du PNA sur l’ARN structuré. Les complexes C2 et C3 correspondent respectivement à la fixation du PNA en duplexe ou en triplex sur l’ARN déplié. Dans les complexes C3, les liaisons Watson-Crick sont représentées par les traits noirs et les liaisons Hoogsteen sont représentées par les traits oranges.

Oligonucléotide	Présence de C1	Concentration en oligonucléotide pour 100% de C2	Présence de C3
PNA AS1	oui	nd	oui
PNA AS2	oui	25 nM	?
PNA 18	oui	nd	oui
LNA 18	non	100 nM	non
PMO 18	non	400-800 nM	non

Tableau 3 : Récapitulatif des résultats représentés sur les Figures 38 et 39.

nd = non déterminée dans la gamme de concentration étudiée

L' IC_{50} correspond à la concentration en PNA requise pour obtenir 50% d'ARN complexé. Cette valeur ne peut être déterminée précisément pour les complexes formés avec l'ARN structuré, du fait de la multiplicité des complexes de mobilité réduite. Cependant, les IC_{50} peuvent être évaluées à partir de l'ARN wt dénaturé par chauffage 5 min à $90^{\circ}C$ (Figure 41). Aussi bien pour l'AS1 que pour l'AS2, les complexes se forment dès les plus faibles concentrations en PNA. 6 nM de PNA AS1 sont requis pour complexer tout l'ARN alors qu'à 3 nM de PNA AS2 il n'y a déjà plus d'ARN libre. Ces gels confirment la formation d'un triplex (2 PNA pour 1 ARN) pour le PNA AS1, qui correspond à la bande de migration la plus retardée et qui apparaît dès 12 nM. La bande correspondant au triplex n'apparaît qu'en présence d'un large excès de PNA (100 nM) pour l'AS2 (qui contient moins de thymines contiguës que l'AS1). Les gels retard correspondant au PNA 18-mer et au LNA 18-mer montrent que le PNA peut former un triplex à de fortes concentrations (comparable au PNA AS2), alors que le LNA 18-mer ne peut former qu'un duplexe, même à de très fortes concentrations (jusqu'à 800 nM). Les duplexes et triplexes observés dans ces expériences correspondent probablement respectivement aux complexes C2 et C3 observés dans les Figures 38 et 39.

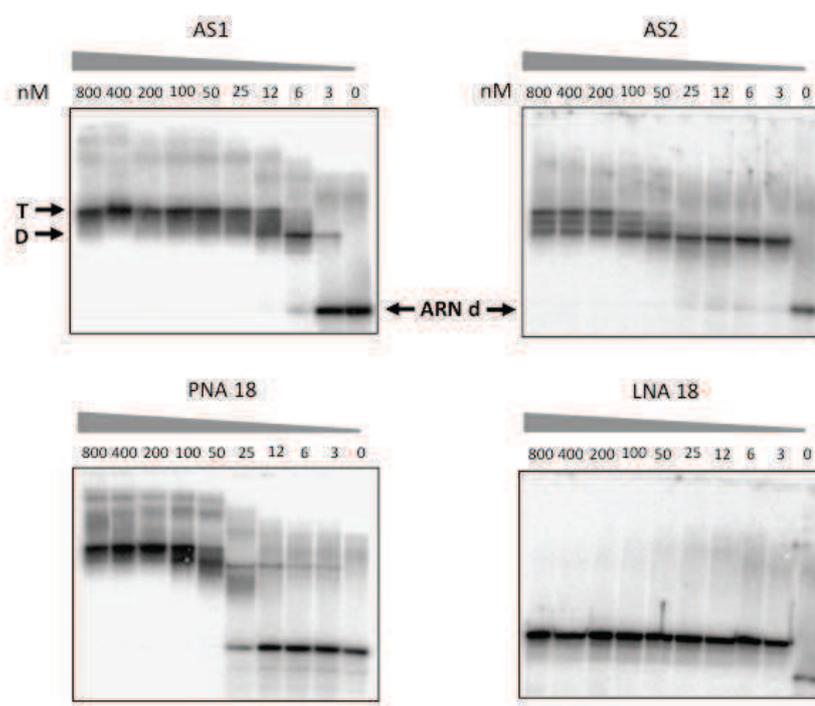


Figure 41 : Retards de migration sur gel de polyacrylamide 15%, des complexes formés entre l'ARN 19 mer radiomarqué (2 nM), dénaturé par préchauffage 10 min à $90^{\circ}C$, et des quantités croissantes de PNA AS1k (gauche) et AS2k (droite), en tampon Tris 50 mM.
ARN d = ARN déplié ; T = Triplex ; D = Duplexe

1. 4. Conclusions

Parmi les trois types de modifications chimiques testées pour inhiber l'élongation de la traduction *in vitro* après fixation sur la séquence PPT du transcrit, seuls les PNA sont efficaces. Bien que capables de déstructurer l'ARN et de s'y hybrider *in vitro*, le LNA et le PMO 18-mer ne parviennent pas à inhiber l'élongation de la traduction de l'intégrase dans le lysat de réticulocyte. La capacité à envahir la structure PPT n'est donc pas un élément de criblage suffisant pour sélectionner des bloqueurs stériques efficaces de l'élongation de la traduction. De plus, la très forte affinité des LNA pour l'ARN ne suffit pas à générer des complexes capables de stopper la machinerie ribosomale en cours d'élongation.

Les PNA sont uniques pour former des structures de type triplex partiel avec leurs cibles ARN polypuriques, ces structures n'ayant pas été observées en gels retard avec le LNA et le PMO 18-mer. La formation de ces triplexes semble donc être nécessaire pour l'inhibition de l'élongation de la traduction par un bloqueur stérique.

Le PNA 18-mer ciblant la séquence PPT est aussi efficace que les PNA 13-mer pour inhiber l'élongation de la traduction dans du lysat de réticulocytes, mais n'inhibe pas l'initiation dans les cellules HeLa 1002 perméabilisées. Il n'existe donc pas de corrélation directe entre les activités *in vitro* et *in cellulo*. Les oligonucléotides LNA et PMO de même séquence sont eux aussi inactifs dans ce système pour inhiber l'initiation de la traduction.

I. 2. Inhibition de l'élongation de la traduction *in cellulo*

L'étude de Lecosnier et al. est la seule qui rapporte l'efficacité *in cellulo* d'un PNA dirigé contre la séquence codante d'un transcrit (Lecosnier et al. 2011). Dans cette étude, la mise en évidence d'une inhibition d'IGF1R- β sans diminution du niveau de l'ARNm a permis d'identifier un mécanisme de répression par blocage stérique et d'exclure l'implication d'un mécanisme de dégradation du transcrit ou de modulation de l'épissage ou de la transcription. Différents mécanismes pourraient être à l'origine de ce blocage stérique de la traduction d'IGF1R- β . Par exemple, l'accumulation de ribosomes stoppés au site de fixation du PNA sur le transcrit pourrait conduire indirectement à l'inhibition de l'initiation de la traduction. Une autre possibilité à envisager est la relocalisation du transcrit lié au PNA dans un compartiment

subcellulaire répresseur de la traduction. La mise en évidence la plus directe d'un mécanisme d'inhibition de l'élongation de la traduction par un PNA serait la détection de la protéine tronquée associée à ce blocage stérique.

Les études réalisées par Lecosnier pour la recherche de l'expression d'une protéine tronquée résultant d'un arrêt de l'élongation de la traduction de l'IGF1R par le PNA 959 n'ont pas permis de mettre en évidence la production d'une telle protéine tronquée dans les cellules. Ceci pourrait s'expliquer par une faible abondance de cette protéine exprimée à partir de l'IGF1R endogène, ou par une stabilité insuffisante, impliquant par exemple une dégradation par le protéasome. Un système d'expression plasmidique à partir d'un promoteur eucaryote fort permettrait théoriquement d'obtenir des taux de protéines plus importants et de faciliter la détection d'une protéine tronquée.

Nous avons étudié l'efficacité des PNA dirigés contre la séquence PPT pour inhiber l'élongation de la traduction de l'intégrase *in cellulo* après transfection d'un plasmide codant cette protéine à partir d'un promoteur fort. Cette étude est limitée par l'instabilité intrinsèque de l'intégrase en absence de la protéine virale régulatrice Rev. Cette instabilité résulte notamment de la présence d'éléments d'instabilité et d'éléments répresseurs agissant en *cis* de manière dépendante de Rev, dans les 5' et 3' UTR ainsi que dans la séquence codante du transcrit (Cherepanov et al. 2000). L'équipe de Cherepanov a obtenu de bons niveaux d'expression de l'intégrase dans plusieurs lignées cellulaires humaines indépendamment de Rev, en construisant une intégrase synthétique dont le contenu du gène a été enrichi en GC (59% de GC contre 40% dans le gène sauvage), de manière à se rapprocher du contenu en GC des gènes humains fortement exprimés (autour de 60%). Cet enrichissement en GC a été réalisé en prenant avantage de la redondance du code génétique afin que le contenu en acides aminés ne soit pas modifié, permettant la production de l'intégrase fonctionnelle (Cherepanov et al. 2000). En revanche, la structure du transcrit qui en résulte est modifiée. D'autres paramètres ont été ajustés pour l'optimisation de ce gène synthétique de l'intégrase :

- les sites potentiels d'épissage ont été supprimés
- le nombre de sites CpG méthylables a été réduit
- des 5' et 3' UTR d'un ARNm stable de mammifères (celui de la β -globine) ont été introduits
- un peptide Met-Gly a été ajouté en 5' pour augmenter l'efficacité d'initiation de la traduction

De bons niveaux d'expression de l'intégrase peuvent donc être atteints avec cette intégrase synthétique et pourraient permettre d'étudier l'efficacité des deux PNA 13-mer à inhiber l'élongation de la traduction dans les cellules humaines. Cependant, ces mutations dans le gène de l'intégrase synthétique ont également modifié la séquence PPT contre laquelle sont dirigés les PNA. Il est donc préalablement nécessaire de rétablir cette séquence PPT sauvage pour conserver une complémentarité parfaite des PNA avec leur cible. Une approche par mutagenèse dirigée a été initiée par Lecosnier durant sa thèse, permettant de restaurer quatre des cinq paires de bases mutées dans la séquence PPT synthétique (Figure 42, bases en rouge). Il restait encore une base à muter pour rétablir la séquence PPT sauvage au sein du gène synthétique de l'intégrase. Il s'agit d'une cytosine qui doit être remplacée par une guanine (en bleu sur la Figure 42). La même approche de mutagenèse dirigée utilisée par Lecosnier a été utilisée. Cette approche de mutagenèse repose sur l'utilisation de primers contenant la mutation à introduire et permettant la synthèse de l'ADN muté par PCR. L'intégralité de la séquence PPT sauvage a ainsi pu être restaurée dans le plasmide d'expression pmRFP-IN, exprimant l'intégrase en fusion avec la RFP (Red Fluorescent Protein). Le gène synthétique de l'intégrase comportant la séquence PPT sauvage restaurée a ensuite été cloné dans le vecteur pVax (pVax-INsyn) qui comporte un promoteur eucaryote CMV et un promoteur T7 de bactériophage, permettant à la fois d'exprimer l'intégrase dans les cellules eucaryotes et par traduction *in vitro*. Ce vecteur comporte de plus une étiquette Flag en amont de l'insert permettant une détection facilitée de la protéine.

```

PPT sauvage :  AAAAGAAAAGGGGGGA
                TTTTCTTTTCCCCCT

PPT synthétique :  AAGCGAAAGGGCGGCA
                   TTCGCTTTCCCGCCGT
  
```

Figure 42 : Séquences PPT sauvage et synthétique.

La séquence PPT issue du gène synthétique de l'intégrase comporte cinq mutations (indiquées en couleur) par rapport à la séquence PPT sauvage. Les mutations indiquées en rouge ont déjà été restaurées.

Nous avons tout d'abord souhaité vérifier que cette intégrase synthétique avec la séquence PPT sauvage s'exprime bien dans les cellules humaines transfectées par le plasmide pVax-INsyn. Pour cela, des cellules DU145 (cellules humaines de cancer prostatique) ont été

transfectées par électroporation avec différentes quantités de ce plasmide et l'expression de l'intégrase a été étudiée par western blot avec un anticorps dirigé contre l'étiquette Flag. La Figure 43 montre qu'une protéine dont la taille correspond à celle de l'intégrase (30 kDa) est exprimée dans les cellules transfectées avec le plasmide, avec un taux d'expression croissant avec la quantité de plasmide transfectée.

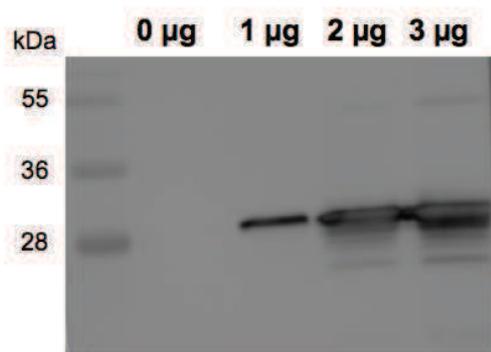


Figure 43 : Expression de l'intégrase synthétique dans les cellules humaines DU145 transfectées avec le plasmide pVax-INsyn.

Les cellules sont transfectées par électroporation avec les quantités indiquées du plasmide pVax-INsyn et cultivées pendant 48 heures supplémentaires. Les lysats cellulaires (40 µg) sont ensuite analysés par western blot, la membrane étant révélée avec un anticorps anti-Flag.

Avant d'étudier l'effet de la co-transfection du plasmide pVax-INsyn et des PNA dirigés contre la séquence PPT sur l'expression de l'intégrase dans les cellules humaines, nous avons voulu nous assurer que l'élongation de la traduction de l'intégrase synthétique peut toujours être inhibée *in vitro*, dans du lysat de réticulocyte de lapin. Pour cela, nous avons utilisé le plasmide pVax-INsyn linéarisé en 3' du gène de l'intégrase pour exprimer le transcrite de l'intégrase synthétique à partir du promoteur T7 par transcription *in vitro*. Ceci est suivi d'une traduction *in vitro* de ces transcrits. La Figure 44 présente les résultats obtenus après transcription et traduction *in vitro* à partir du plasmide pVax-INsyn. Dans un premier temps, 3 µL de transcrits ont été traduits en présence du PNA AS2 à 0,5 et 1 µM (Figure 44A). Aucune inhibition de la traduction de l'intégrase n'est observée dans ces conditions. Ce résultat est étonnant, compte-tenu des résultats obtenus dans ces mêmes conditions pour l'intégrase sauvage exprimée à partir du plasmide pRP159-IN (voir Matériel et Méthodes) (Figure 32). Afin d'augmenter le ratio PNA:ARN, l'expérience a été reproduite avec trois fois moins de transcrits (Figure 44B) et avec une concentration en PNA AS2 plus élevée (2 µM).

Une légère inhibition est obtenue à forte concentration, mais aucune protéine tronquée n'est détectée, témoignant d'une efficacité beaucoup plus faible que sur l'intégrase sauvage. L'efficacité du PNA AS1 a également été évaluée dans ces conditions, et ce PNA montre une efficacité légèrement supérieure à celle de l'AS2 pour inhiber la protéine entière, mais bien inférieure à celle sur l'intégrase sauvage. De plus, une très faible quantité de protéine tronquée est observée. La Figure 44C montre que la dénaturation des ARN par chauffage 5 min à 60°C avant la traduction n'augmente pas l'efficacité du PNA AS1.

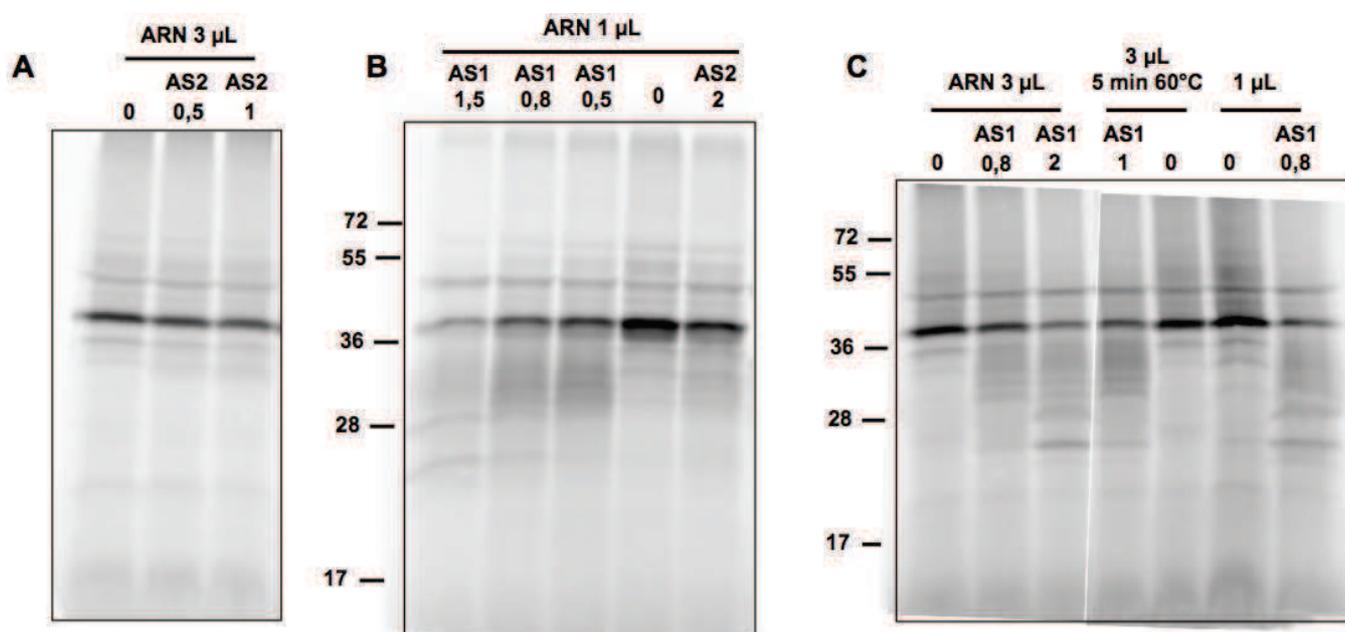


Figure 44 : Traductions *in vitro* de l'intégrase synthétique dans du lysat de réticulocyte de lapin, en présence ou en absence des PNA AS1 et AS2.

Les transcrits de l'intégrase synthétique sont exprimés à partir du plasmide pVax-INSyn par transcription *in vitro* à partir du promoteur T7. Différents volumes de transcrits (1 ou 3 L) sont utilisés pour la traduction dans du lysat de réticulocyte de lapin en présence de méthionine ^{35}S et en présence ou en absence des PNA AS1 et AS2 aux concentrations indiquées en haut des puits (en μM).

Nous avons donc décidé de poursuivre la recherche de protéine tronquée sur le système IGF1R, à partir d'un plasmide pMyc-IGF1R, contenant l'ADNc de l'IGF1R taggué avec un épitope Myc et inséré en aval d'un promoteur fort CMV. Ce plasmide nous a été fourni par le Dr McCaulay (Riedemann et al. 2007). La protéine exprimée à partir de ce plasmide sera donc taguée sur la sous-unité α de l'IGF1R. Des expériences de co-transfection des cellules DU145 avec ce plasmide et le PNA 959 suivies de la migration des protéines sur

gel de polyacrylamide natif et d'un western blot avec un anticorps anti-Myc sont en cours et pourraient permettre de détecter l'éventuelle production d'une protéine tronquée.

I. 3. Optimisation du PNA anti-IGF1R

3.1. Le PNA 959 et ses variants de taille

La taille des PNA pour une efficacité maximale est à déterminer pour l'optimisation de leur activité biologique dans chaque système d'étude considéré. Des PNA trop courts pourraient former des complexes de stabilité trop faible pour stopper l'élongation de la traduction. A l'inverse, l'activité de PNA trop longs pourrait être pénalisée par une faible solubilité et/ou l'augmentation des structures intramoléculaires limitant la fixation à la séquence cible. Par exemple, une étude montre qu'un PNA 17-mer est efficace pour inhiber l'initiation de la traduction de la luciférase en se fixant sur une séquence IRES (Nulf & Corey 2004). Dans ce cas, l'utilisation de PNA plus longs, de 19 et 21 bases, conduit à des inhibitions plus faibles. De plus, l'utilisation de PNA plus courts pourrait constituer un avantage en terme de pénétration cellulaire. Afin de déterminer l'influence de la taille des PNA sur l'activité d'inhibition de l'élongation de la traduction de l'IGF1R, le PNA 959 17-mer a été tronqué, côté C-terminal (PNA N-16 à N-13) et côté N-terminal (PNA C-16 à C-11), de manière à générer 10 PNA variants de taille par rapport au PNA 959, dont les tailles varient de 11 à 16 bases (Tableau 4).

Le PNA 959 inhibe l'élongation de la traduction de l'IGF1R en formant une structure de type triplexe partiel (fixation de deux PNA sur un même ARN) avec son ARN cible. La formation de triplexes entre les PNA et l'ARN implique la formation de triplets T.AT ou C⁺.CG à pH compris entre 5 et 5,5. A pH neutre, seuls les PNA riches en thymine sont donc capables de former ce genre de structures. Cette étude permettra de déterminer l'implication des bases en C- et N-terminal dans la formation du complexe qui arrête l'élongation de la traduction. L'activité de ces PNA variants de taille a été évaluée dans un premier temps par traduction *in vitro*, en étudiant à la fois l'inhibition de la traduction de la protéine entière, et la formation de la protéine tronquée. Les complexes formés entre les différents PNA et l'ARN complémentaire 959 (séquence CAUAGAAAGAGAAAUA) ont été caractérisés *in vitro* par gels retard et par des analyses spectroscopiques. Enfin, les activités biologiques *in cellulo* de ces PNA ont été étudiées par western blot après électroporation dans les cellules DU145.

L'efficacité d'inhibition de la traduction et la capacité de ces PNA à former des triplexes partiels avec l'ARN ont été comparées à celles du PNA 959 de référence.

PNA	Séquence (N vers C)
959 (17-mer)	TTATTTCCTTTCTATG
N-16	TTATTTCCTTTCTAT
N-15	TTATTTCCTTTCTA
N-14	TTATTTCCTTTCT
N-13	TTATTTCCTTTTC
C-11	TCTCTTTCTAT
C-12	TTCTCTTTCTAT
C-13	TTCTCTTTCTATG
C-14	TTTCTCTTTCTATG
C-15	ATTCTCTTTCTATG
C-16	TATTCTCTTTCTATG



Tableau 4 : Séquence des PNA raccourcis en C-terminal (PNA N-16 à N-13) ou en N-terminal (PNA C-16 à C-11) par rapport au PNA 959.

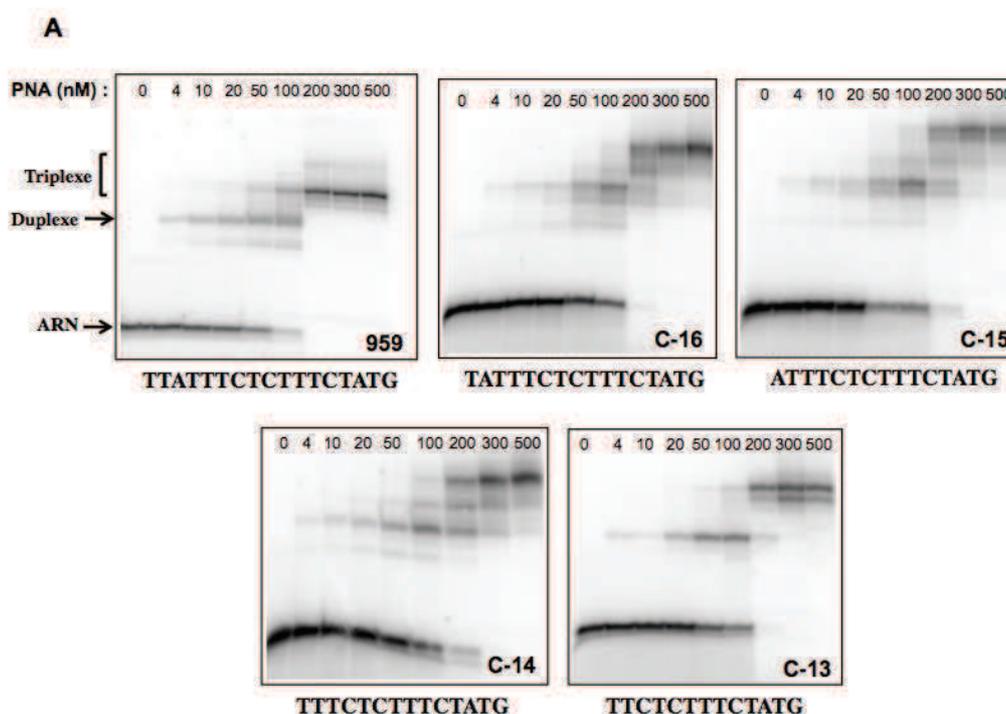
Tous ces PNA comportent deux lysines en C-terminal, de manière à augmenter leur solubilité. Le trait noir représente la limite entre l'exon 14 et l'exon 15.

3. 2. Activité *in vitro*

a) Caractérisation des complexes formés entre les PNA et l'ARN

Afin de caractériser les complexes formés entre les PNA à différentes concentrations et l'ARN 959 17-mer (complémentaire du PNA 959) radiomarqué en 5', des expériences de retard de migration sur gel natif de polyacrylamide ont été réalisées. La Figure 45 représente les résultats obtenus pour les différents PNA. Le gel correspondant au PNA 959 montre la présence de deux principales bandes retardées par rapport à la migration de l'ARN seul (point 0 nM en PNA). La première bande retardée (bande la plus basse) se forme dès la plus faible concentration en PNA (4 nM) et correspond à un duplexe PNA:ARN. La seconde bande retardée, migrant encore moins rapidement, peut correspondre à une structure de type triplexe, engageant deux molécules de PNA sur une même molécule d'ARN par des liaisons Watson-

Crick et Hoogsteen. Cette bande apparaît à des concentrations plus élevées en PNA (à partir de 50 nM) et devient unique dès 200 nM. A partir de cette concentration, tout l'ARN est complexé aux molécules de PNA sous forme de ce complexe, comme en atteste la disparition totale de la bande correspondant à la migration de l'ARN libre. Tous les PNA raccourcis en N-terminal (PNA C-16 à C-13, Figure 45A) ou en C-terminal (PNA N-16 à N-13, Figure 45B) par rapport au PNA 959, forment ces deux types de complexes. La Figure 46 correspond à la même expérience, dans laquelle les complexes formés entre l'ARN et PNA C-13 à C-16 et N-13 à N-16 ont été déposés sur le même gel, à 100 ou 300 nM en PNA. A 100 nM en PNA, les deux types de complexes peuvent généralement être observés, tandis qu'à 300 nM seul les complexes de types triplexes sont présents. Les bandes retardées ne migrent pas à la même hauteur pour chacun des PNA, le raccourcissement d'une base de PNA augmentant à chaque fois légèrement la vitesse de migration du complexe. On observe que tous les PNA forment des complexes en duplexe et en triplex. Les complexes de haut poids moléculaire formés par les PNA N-13 et N-14 ne migrent pas sous la forme d'une bande discrète, ce qui signifie probablement que ces complexes sont dissociés pendant la migration. Pour le PNA C-13, deux bandes distinctes de hauts poids moléculaires sont observées. Ces triplexes pourraient correspondre à des isomères de structure, qui confèrent aux triplexes des propriétés de migration différentes (Hansen et al. 2001).



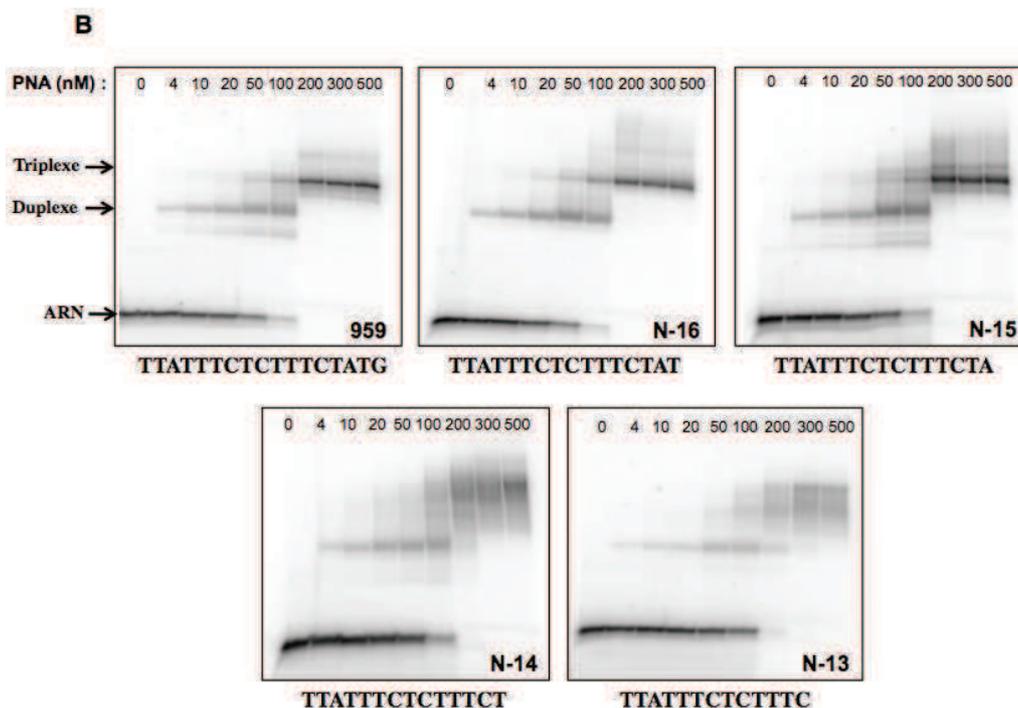


Figure 45 : Retards de migration sur gel de polyacrylamide 15% (EMSA) des PNA C-16 à C-13 (A) et N-16 à N-13 (B).

Les complexes entre 150 nM d'ARN 959 17-mer radiomarqué en 5' et le PNA indiqué aux concentrations indiquées dans chaque puits (de 4 à 500 nM) sont formés pendant 10 min à 37°C dans un tampon Tris 50 mM pH8 puis les échantillons sont migrés sur un gel natif de polyacrylamide 15%.

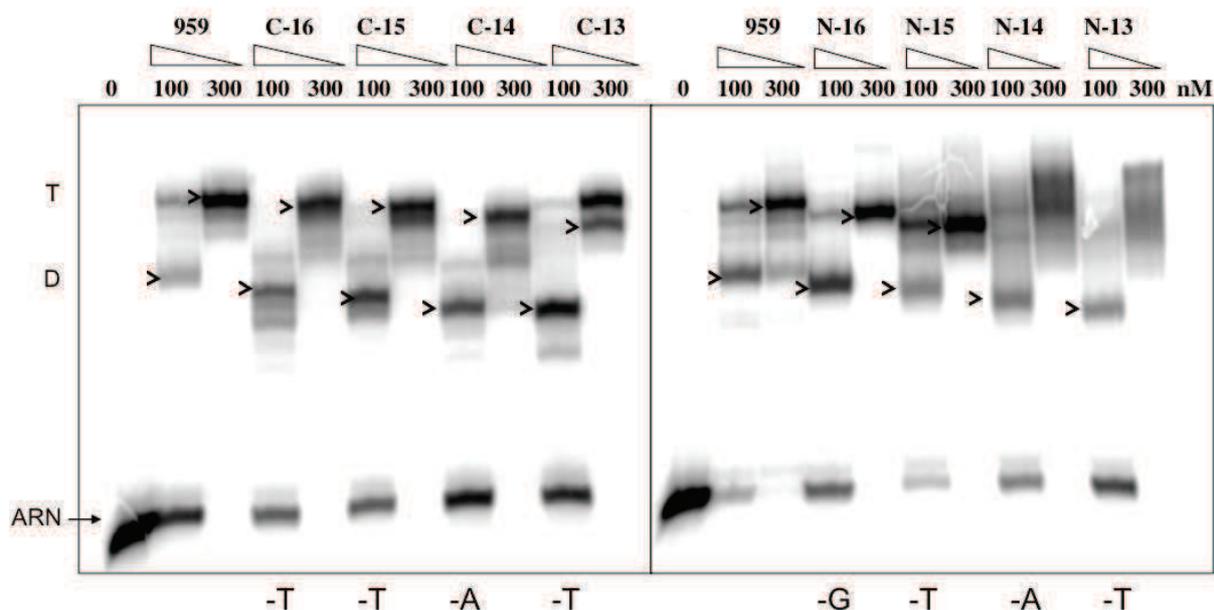


Figure 46 : Séparation sur gel natif de polyacrylamide 15% (gel retard), des complexes formés entre l'ARN 959 17-mer radiomarqué et le PNA indiqué, à 100 ou 300 nM.

D = Duplexe ; T = Triplex

A partir des gels présentés sur la Figure 45, des quantifications de l'ARN non complexé ont été réalisées, et représentées graphiquement en fonction de la concentration en PNA. Ces représentations graphiques ont permis de déterminer l'IC₅₀ correspondant à chaque PNA, qui est la concentration en PNA pour laquelle 50% de l'ARN est complexé. Le Tableau 5 récapitule les valeurs d'IC₅₀ ainsi obtenues. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur, situées globalement entre 200 et 400 nM.

PNA	Séquence (N vers C)	IC ₅₀ (nM)
959 (17-mer)	TTATTTCTCTTTCTATG	222,2
N-16	TTATTTCTCTTTCTAT	138,9
N-15	TTATTTCTCTTTCTA	245,6
N-14	TTATTTCTCTTTCT	315,8
N-13	TTATTTCTCTTTC	482,5
C-13	TTCTCTTTCTATG	350,9
C-14	TTTCTCTTTCTATG	418,2
C-15	ATTTCTCTTTCTATG	309,1
C-16	TATTTCTCTTTCTATG	386,0

Tableau 5 : Valeurs des IC₅₀ (nM) correspondants à la fixation des différents PNA variants de taille du 959 sur l'ARN 959 17-mer.

Les valeurs des IC₅₀ sont déterminées graphiquement à partir des expériences de gels retard, après quantification de l'ARN non complexé en fonction de la concentration en PNA.

L'absorbance des bases azotées à 260 nm est plus importante quand celles-ci ne sont pas engagées dans une liaison avec un brin complémentaire (phénomène d'hyperchromisme des bases azotées). La dénaturation et la renaturation thermique des acides nucléiques peuvent donc être suivies par spectroscopie d'absorption, en mesurant leur absorbance à 260 nm en fonction de la température. Nous avons ainsi suivi la formation et la dénaturation des complexes formés entre les différents PNA et l'ARN 959 17-mer. L'absorbance à 260 nm a été corrigée par soustraction de l'absorbance à 330 nm, longueur d'onde à laquelle les absorbances sont faibles et ne varient pas en fonction de la température, permettant ainsi de corriger d'éventuels artéfacts. Dans le cas de simples duplexes, les courbes de dénaturation (chauffage) et renaturation (refroidissement) ont une forme sigmoïde et sont superposées. Leur transition correspond au passage entre la forme associée et la forme dissociée. La *T_m* (température de fusion, c'est-à-dire température pour laquelle 50% des molécules sont complexées) peut alors être déterminée graphiquement et permet d'évaluer la stabilité des duplexes formés. Le PNA 959 forme avec son ARN complémentaire des structures

complexes de type triplexes. Au cours des expériences de dénaturation/renaturation thermique, la cinétique de formation et de dénaturation de ces complexes est incompatible avec le temps de mesure. L'équilibre n'est pas atteint, et un phénomène d'hystérésis est observé, c'est-à-dire une non superposition des courbes d'association et de dissociation, qui reflète en général la formation de complexes trimoléculaires (Mergny & Lacroix 2003). La présence d'hystérésis est donc une des caractéristiques mettant en évidence la formation de triplexes. La Figure 47 représente les résultats obtenus pour le PNA 959 et les différents PNA raccourcis. On observe que les courbes correspondant à chacun de ces PNA présentent un phénomène d'hystérésis comme le PNA 959, suggérant que ces PNA ont conservé la capacité à former des triplexes partiels stables avec l'ARN 959. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au cours des expériences de gels retard.

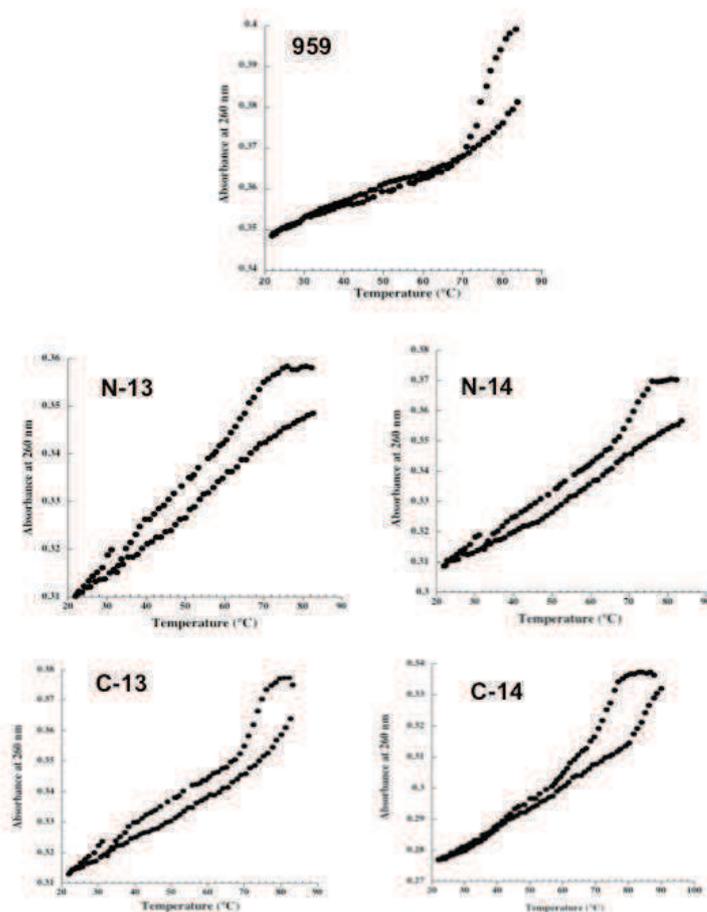


Figure 47 : Analyses spectroscopiques du PNA 959 et des PNA 13- et 14-mer.

Les expériences sont réalisées dans un tampon contenant 100 mM de KCl et 10 mM de cacodylate de sodium à pH, en présence de 1 μ M d'ARN 17-mer et de 1 μ M du PNA indiqué. Ces graphiques représentent l'évolution de l'absorbance à 260 nm corrigée par l'absorbance à 330 nm, en fonction de la température. La vitesse de chauffage et de refroidissement est de 0,2°/min. Les courbes de renaturation et de dénaturation sont tracées pour chaque PNA.

b) Efficacité pour arrêter l'élongation de la traduction

L'efficacité de ces complexes pour arrêter l'élongation de la traduction a ensuite été déterminée par des expériences de traduction *in vitro* dans du lysat de réticulocytes de lapin, en présence des différents PNA. Pour cela, le plasmide pcDNA3-IGF1R, exprimant l'IGF1R à partir d'un promoteur de phage SP6 est utilisé comme matrice pour la transcription. Les transcrits de l'IGF1R sont ensuite traduits dans le lysat de réticulocytes de lapin, en présence de méthionine ^{35}S et du PNA à 37°C . Dans les cellules humaines, l'IGF1R est synthétisé sous forme d'un précurseur protéique constitué d'une seule chaîne $\alpha\beta$ qui sera ensuite glycosylée par des protéines chaperonnes, et clivée par la furine (PACE, pour Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme) (Khatib et al. 2001), générant une chaîne α de 135 kDa et une chaîne β de 90 kDa. Deux chaînes α et deux chaînes β s'associent ensuite pour former l'hétérotétramère mature. Dans le lysat de réticulocytes de lapin, les enzymes nécessaires à la maturation post-traductionnelle du précurseur ne sont pas présentes. C'est pourquoi une protéine unique de 155 kDa correspondant au précurseur est produite. La protéine tronquée résultant de l'arrêt de la traduction par le PNA 959 a une taille de 109 kDa (Lecosnier et al. 2011). L'étape de traduction du précurseur de l'IGF1R est suivie d'une étape d'enrichissement par immunoprécipitation (IP) avec l'anticorps H60. Cet anticorps est dirigé contre la partie N-terminale de la chaîne β (Figure 47). La protéine tronquée générée par l'arrêt de la traduction en position 959 de l'ARNm conserve son domaine transmembranaire mais est dépourvue de la partie C-terminale de la sous-unité β . L'anticorps H60 peut donc reconnaître à la fois le précurseur entier (155 kDa) et le précurseur tronqué (109 kDa).

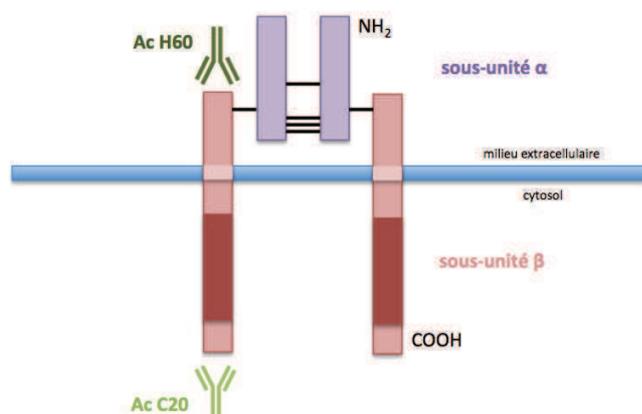


Figure 48 : Représentation schématique de la fixation des anticorps (Ac) H60 et C20 sur l'IGF1R.

L'anticorps H60 reconnaît la partie N-terminale de la sous-unité β . L'anticorps C20 reconnaît la partie C-terminale de la sous-unité β .

La Figure 49 représente les résultats obtenus après traduction *in vitro* et IP par l'anticorps H60. La traduction en absence d'oligonucléotide (point 0) génère une protéine majoritaire qui migre à 155 kDa, ainsi que deux protéines plus courtes. Ces protéines plus courtes pourraient correspondre à des peptides issus de la dégradation de la protéine de 155 kDa, ou à des protéines dont la synthèse a débuté à partir de codons AUG plus en aval par rapport au premier AUG, ou encore à des arrêts naturels de traduction à des sites de l'ARN fortement structurés. La position précise de la protéine tronquée est obtenue par la migration sur le même gel des protéines obtenues après traduction en présence du PO 959 (de même séquence que le PNA 959) et de RNase H. Cet oligonucléotide se fixe à la même position du transcrit que le PNA 959 et inhibe la traduction en recrutant la RNase H qui clive le transcrit et génère une protéine tronquée dont la taille correspond au site de fixation de l'oligonucléotide sur le transcrit. En présence du PO 959, la bande correspondant au précurseur entier de 155 kDa est inhibée et une bande de migration plus rapide est enrichie, correspondant à la protéine tronquée de 109 kDa. En présence du PNA 959, la synthèse du précurseur est inhibée, au profit de la synthèse de la protéine tronquée, qui migre de manière identique à celle générée par l'oligonucléotide contrôle PO 959. Il est intéressant de remarquer que la migration de la protéine tronquée générée par le PO et le PNA est identique à celle de la première des deux bandes observées dans le témoin sans oligonucléotide (0). L'hypothèse d'arrêts précoces naturels de la traduction est donc privilégiée. On suppose qu'une structure présente sur l'ARNm favorise un arrêt spontané des ribosomes à cette position, et que cet arrêt est facilité en présence d'un PNA à cette même position. La spécificité de cette inhibition est déterminée par le PNA 17-mer contrôle C1, possédant la même composition en bases que le PNA 959 (séquence *scramble*). Aucun enrichissement en protéine tronquée n'est observé avec ce PNA contrôle par rapport au témoin (0) (Figure 49A, B et C). On remarque que les PNA C-16 à C-13 (Figure 48A) et N-16 à N-13 (Figure 49B) sont aussi efficaces que le PNA 959 pour induire la production de la protéine tronquée de 109 kDa après arrêt de l'élongation de la traduction *in vitro*.

Ces résultats sont surprenants, surtout pour le PNA C-13, pour qui la perte de 4 thymine en N-terminal n'affecte ni sa capacité à former une structure stable de type triplex, ni sa capacité à stopper la machinerie ribosomale *in vitro*. Nous avons décidé d'étudier également l'activité d'arrêt de l'élongation de la traduction des PNA C-12 et C-11, dans lesquels la guanine en C-terminal a été supprimée et également une thymine en N-terminal pour le C-11, par rapport au PNA C-13 (Tableau 4). Les résultats obtenus en traduction *in*

in vitro montrent que ces deux PNA conservent leur efficacité pour arrêter l'élongation de la traduction de l'IGF1R dans le lysat de réticulocytes (Figure 49C).

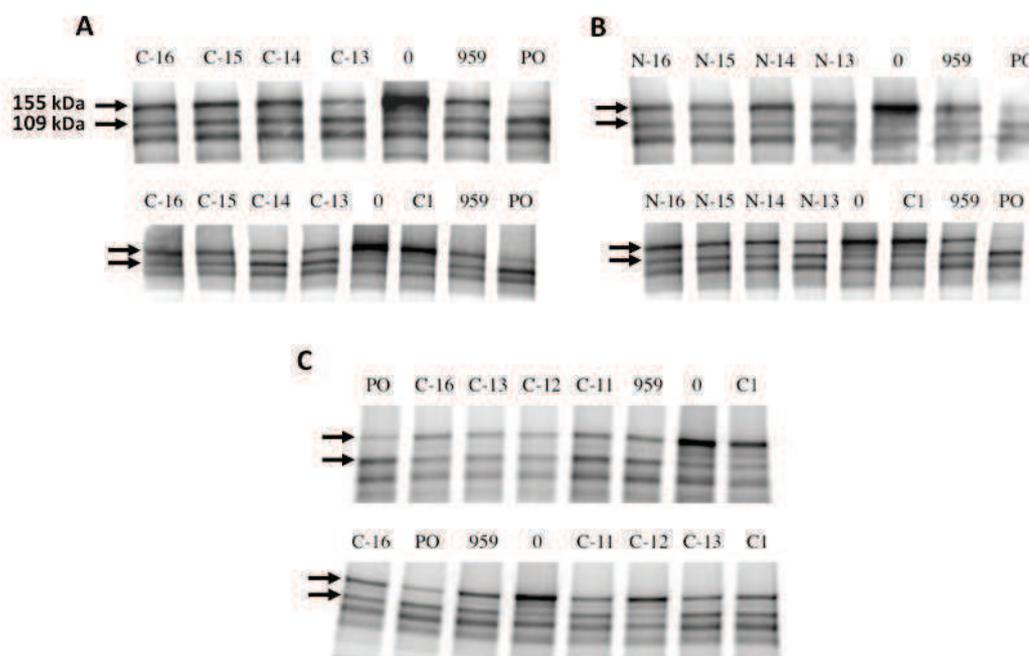


Figure 49 : Inhibition de la traduction *in vitro* et formation de la protéine tronquée, en présence des différents PNA variants de taille.

Les transcrits de l'IGF1R sont traduits dans du lysat de réticulocytes de lapin en présence de méthionine ^{35}S et des PNA indiqués à $0,3 \mu\text{M}$ ou du PO 959 à $0,25 \mu\text{M}$ et d'une unité de RNase H. Une immunoprécipitation est ensuite réalisée avec $3 \mu\text{g}$ d'anticorps H60, dirigé contre la partie N-terminale de la chaîne β d'IGF1R. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel SDS-PAGE et la révélation des protéines synthétisées dans le lysat est réalisée par autoradiographie. La taille du précurseur IGF1R entier est de 155 kDa, celle de la protéine tronquée est de 109 kDa. A. PNA C-13 à C-16, raccourcis en N-terminal par rapport au PNA 959 ; B. PNA N-13 à N-16, raccourcis en C-terminal par rapport au PNA 959 ; C. PNA C-11 à C-13. Deux gels, correspondant à deux expériences indépendantes, sont présentés dans chaque cas.

3. 3. Activité *in cellulo*

L'activité des PNA courts (≤ 13 -mer) a également été évaluée dans les cellules humaines DU145. Pour cela, les cellules ont été transfectées par électroporation Amaxa avec les PNA avant d'analyser l'expression de la chaîne β d'IGF1R par western blot.

Notons que la séquence cible du PNA 959 sur l'ARNm correspond à une partie de l'exon 14 et à une partie de l'exon 15. Ceci permet d'exclure la possibilité de la fixation du PNA sur l'ADN et le pré-ARNm, dans lesquels les deux exons sont séparés d'un intron. Ainsi,

le PNA 959 ne peut pas, en théorie, inhiber l'épissage ou la transcription de l'IGF1R. En effet, il a été montré que l'ARNm n'est pas inhibé dans les cellules électroporées avec le PNA 959, dans des conditions où l'expression de la protéine est diminuée (Lecosnier et al. 2011). L'effet biologique résulte donc bien d'un blocage stérique de la traduction, sans clivage de l'ARN. L'anticorps utilisé pour la révélation des western blot est l'anticorps C20, qui reconnaît la partie C-terminale de la chaîne β d'IGF1R (Figure 48). Cette anticorps ne peut donc pas reconnaître la protéine tronquée formée par arrêt de l'élongation de la traduction par le PNA 959, car celle-ci est constituée de la chaîne β déplétée de sa partie C-terminale. En revanche, une diminution de la reconnaissance de la sous-unité β pourra être observée, soit en conséquence de l'inhibition de la traduction de la chaîne entière au profit ou non de la formation de la protéine tronquée, soit résultant de l'inhibition de l'initiation de la traduction. Quel que soit le mécanisme d'inhibition impliqué, l'analyse de l'expression de la sous-unité β permet d'évaluer l'activité antisens des PNA dans les cellules. La quantification du signal obtenu, normalisé par la quantité de protéine déposée (évaluée par quantification de la bande correspondant à l'actine), permet de calculer le pourcentage d'inhibition d'IGF1R- β dans les cellules. Le contrôle de la spécificité des PNA est réalisé à l'aide du PNA *scramble* 17-mer C1 (*scramble* du PNA 959) ainsi que d'un PNA *scramble* 13-mer : le scr13 (voir séquences dans le Matériel et Méthodes).

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 50 (expérience en duplicate). La comparaison d'efficacité des PNA N-13 et C-13 montre que les PNA raccourcis en C- et N-terminal ont une très bonne activité. Cependant, le PNA 959, déposé ici comme contrôle positif, inhibe très peu l'expression d'IGF1R- β . En effet, on obtient ici 30 et 32% d'inhibition alors qu'à cette concentration (1 μ M) on obtient normalement une inhibition de l'ordre de 60% (Lecosnier et al. 2011).

La Figure 51 présente les résultats obtenus pour les PNA C-11 et C-12. On observe que ces PNA induisent une inhibition d'IGF1R- β similaire à celle obtenue pour le PNA C-13.

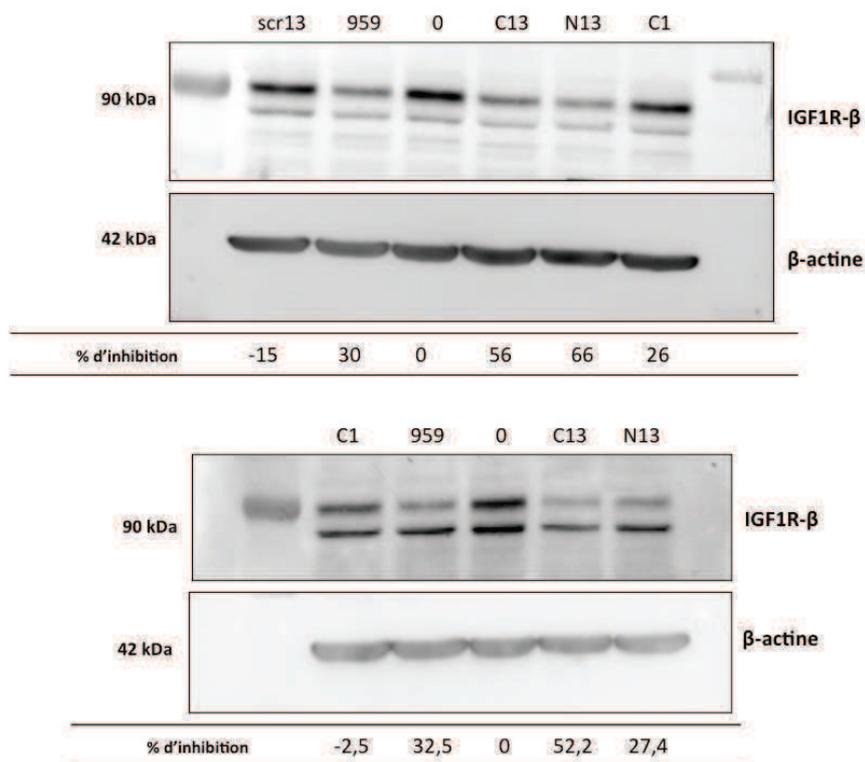


Figure 50 : Inhibition de l'expression de la sous-unité β de l'IGF1R par les PNA N-13 et C-13 dans les cellules humaines DU145.

Les cellules DU145 ont été électroporées en présence des PNA indiqués, à 1 μM, puis un western blot est réalisé sur les lysats cellulaires 48h après transfection. L'expression d'IGF1R-β (90 kDa) est révélée par l'anticorps C20. La quantité de protéines déposée dans chaque puits est normalisée par révélation de la β-actine (42 kDa). Sous chaque puits est indiqué le % d'inhibition d'IGF1R-β par rapport aux cellules électroporées sans PNA (point 0).

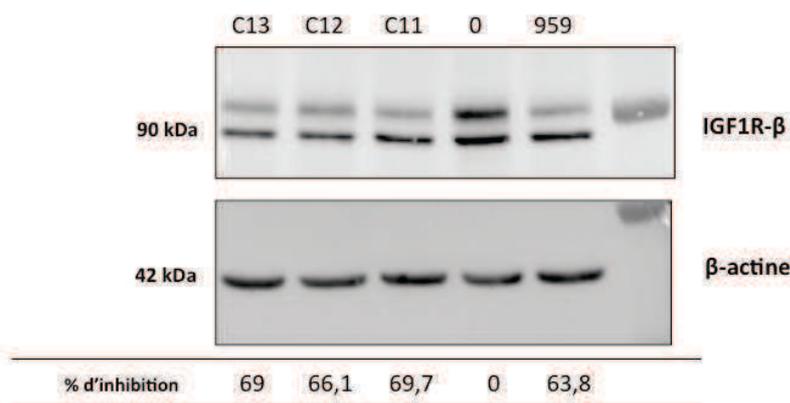


Figure 51 : Inhibition de l'expression de la sous-unité β de l'IGF1R par les PNA C-11 et C-12 dans les cellules humaines DU145.

Les cellules DU145 ont été électroporées en présence des PNA indiqués, à 1 μM, puis un western blot est réalisé sur les lysats cellulaires 48h après transfection. L'expression d'IGF1R-β (90 kDa) est révélée par l'anticorps C20. La quantité de protéines déposée dans chaque puits est normalisée par révélation de la β-actine (42 kDa). Sous chaque puits est indiqué le % d'inhibition d'IGF1R-β par rapport aux cellules électroporées sans PNA (point 0).

3. 4. Conclusions

La perte des bases TTATT en N-terminal et TATG en C-terminal ne semble pas affecter beaucoup l'activité d'arrêt d'élongation du PNA. Aux vues des résultats de gels retards et des expériences de dénaturation/renaturation thermique, la séquence centrale TCTCTTTC serait suffisante pour la formation de triplexes sur l'ARN. Cependant, la perte des bases en C-terminal semble déstabilisant pour ces triplexes, comme en attestent les résultats de gels retard pour les PNA N-13 et N-14. Le PNA C-13 semble être un bon candidat pour inhiber l'expression de l'IGF1R- β *in cellulo* et pour les études d'internalisation cellulaires (voir Chapitre II).

I. 4. Discussion

Ces résultats mettent en évidence la capacité unique des PNA à arrêter l'élongation de la traduction, lorsqu'ils sont dirigés contre une séquence en amont de l'AUG.

Efficacité de différentes modifications chimiques pour l'arrêt de l'élongation de la traduction

En effet, la comparaison de l'efficacité des différentes modifications chimiques testées (LNA18-PMO18-PNA18, isoséquentiels) a montré que seuls les PNA inhibent l'élongation de la traduction de l'intégrase *in vitro*.

Les PMO sont neutres comme les PNA mais ont une affinité pour l'ARN nettement inférieure à celle des PNA. Pourtant, le PMO18 parvient à se fixer sur l'ARN PPT structuré et à défaire la structure. Les LNA, au contraire, ont une affinité pour l'ARN supérieure à celle des PNA et les expériences de gel retard ont montré que le LNA18 se fixe sur l'ARN PPT structuré et déroule efficacement la structure. La stabilité des complexes n'est donc pas déterminante pour leur capacité à stopper la machinerie ribosomale. Ceci est en accord avec les conclusions de Knudsen et Nielsen, qui ont montré que des duplexes même très stables n'arrêtent pas l'élongation de la traduction (Knudsen & Nielsen 1996). De même, la capacité de l'oligonucléotide à se fixer sur l'ARN PPT structuré et à défaire la structure n'est pas suffisante pour inhiber l'élongation de la traduction.

Les expériences de gels retard ont montré que seuls les PNA (13-mer ou 18-mer) forment des structures de type triplexes avec l'ARN. Des expériences de dénaturation/renaturation thermiques (formation d'un hystérésis ou non) seraient nécessaires

pour valider les résultats obtenus à partir des gels retard. Les bases impliquées dans la formation de ces triplexes sont les thymines à pH neutre. Dans ces triplexes partiels, un premier PNA serait complètement apparié par liaisons Watson-Crick, et un second PNA serait apparié par liaisons Hoogsteen uniquement par ses thymines, les cytosines et les purines restant non appariées. Ces structures sont probablement à l'origine de l'efficacité de l'arrêt de la machinerie ribosomale.

Le manque d'efficacité des oligonucléotides LNA et PMO pour inhiber l'élongation de la traduction a également été observé par Lecosnier, avec le LNA 959 (de même séquence que le PNA 959, avec un nucléotide sur deux de chimie LNA) et le PMO 959 (CTGCTGTTATTTCTCTTTCTATGGA, 25-mer) (thèse de Sabine Lecosnier). L'analyse par gels retard et spectroscopie d'absorption des complexes formés entre ces oligonucléotides et l'ARN complémentaire 959 (pour le LNA) ou l'ARN complémentaire 25-mer (pour le PMO), n'a pas mis en évidence la formation d'un triplex, contrairement aux résultats obtenus pour le PNA 959. De plus, le duplexe apparaît à des concentrations en oligonucléotide plus élevées que dans le cas du PNA 959 (100 nM contre 4 nM pour le PNA).

Les LNA sont capables de former des triples hélices canoniques dans le grand sillon de l'ADN (Simon et al. 2008) mais aucune structure de type triplex n'a été décrite entre ces molécules et l'ARN. Leur flexibilité restreinte résultant du pont méthylène dans leur structure pourrait être à l'origine de cette différence entre les LNA et les PNA pour former des triplexes partiels sur l'ARN. Il a été montré dans l'équipe que des LNA 'pinces' (2 molécules de LNA antiparallèles reliées par un bras de liaison) peuvent inhiber l'élongation de la traduction *in vitro* de l'intégrase. L'utilisation de LNA 'pinces' semble être une nécessité pour former des complexes capables de stopper la machinerie de traduction en cours d'élongation.

Une hypothèse pour expliquer la nécessité de la formation de tels complexes trimoléculaires par les PNA pour stopper les ribosomes est leur encombrement stérique, supérieur à celui généré par un simple duplexe. La question du temps de vie de ces complexes serait également intéressante à considérer. Les duplexes, même très stables, pourraient avoir un temps de résidence sur la cible plus court que celui des triplexes, et être plus sensibles à la fonction hélicase des ribosomes.

Rôle de la structure de l'ARN

Malgré la capacité des PNA à envahir des structures d'ARN et à s'y fixer, la structure de l'ARN cible semble également avoir un rôle important pour l'inhibition de la traduction. En effet, les PNA AS1 et AS2 inhibent efficacement l'élongation de la traduction de

l'intégrase sauvage *in vitro*, avec production de la protéine tronquée. Leur activité sur l'intégrase synthétique dont la séquence PPT a été restaurée par mutagenèse dirigée est fortement diminuée, l'inhibition de la protéine entière étant plus faible, avec peu ou pas de protéine tronquée détectée. Ces différences d'activité pourraient résulter de différentes structures encadrant ou englobant la séquence PPT dans les ARN sauvage et synthétique. Certaines structures peuvent potentiellement empêcher la fixation des oligonucléotides et ainsi influencer leur capacité à stopper la machinerie ribosomale. Par exemple, certains LNA dirigés contre la structure IRES du virus de l'hépatite C ne sont pas efficaces pour inhiber l'initiation de la traduction (Nulf & Corey 2004). Egalement, une modulation de la fixation de l'oligonucléotide sur la cible pourrait être rencontrée, les structures favorisant par exemple la formation d'un complexe de type duplexe par rapport à un triplex.

Au contraire, des structures de l'ARN pourraient également favoriser l'arrêt de l'élongation de la traduction, si une structure particulière est présente par exemple juste en amont du site de fixation du PNA et ralenti au préalable les ribosomes. Ceci semble être le cas pour l'IGF1R puisque nous observons des bandes correspondant à des protéines plus courtes que le précurseur entier, et qu'une de ces protéines est de même taille que la protéine tronquée générée suite au clivage par le PO959 ou à l'arrêt de l'élongation par les PNA. Il est donc possible que le site de fixation des PNA se situe à proximité d'un site d'arrêt naturel de la traduction.

Influence de la taille de l'oligonucléotide sur son activité

Les activités d'inhibition de l'initiation de la traduction de ces oligonucléotides PNA, LNA et PMO dirigés contre la séquence PPT ont été déterminées dans les cellules HeLa 1002 perméabilisées. Aucun des oligonucléotides 18-mer n'inhibe l'initiation de la traduction de la luciférase, alors que les deux PNA 13-mer sont actifs. Ce résultat est plutôt surprenant car les PNA, LNA et PMO sont décrits dans la littérature comme des bloqueurs stériques efficaces de l'initiation de la traduction, même lorsqu'un simple duplexe est formé avec l'ARN (Margus Pooga et al. 1998; Fluiter et al. 2003; Nasevicius & Ekker 2000). Toutefois, plusieurs exemples de l'activité modeste des LNA pour inhiber l'initiation de la traduction sont rapportés (Gee et al. 1998; Nulf & Corey 2004). Le fait que le PNA 18-mer ne soit pas actif alors que les PNA 13-mer le sont, pourrait s'expliquer par la formation de structures intra ou intermoléculaires, pénalisantes pour la fixation du PNA sur la cible. Une perte d'activité associée à l'augmentation de la longueur d'un PNA a déjà été rapportée dans la littérature (Nulf & Corey 2004). Une augmentation de taille entre 10 et 18-mer peut également être

associée à un gain d'activité (Doyle et al. 2001). L'effet de la taille dépend donc probablement de la séquence du PNA et de la nature des interactions impliquées.

Dans le cas des PNA dirigés contre l'IGF1R, le raccourcissement du PNA 959 17-mer en N-terminal ou en C-terminal ne semble pas pénaliser son activité biologique *in vitro* et *in cellulo*. Intuitivement, on pourrait penser que la stabilité du complexe au niveau de l'extrémité C-terminale du PNA est plus importante car cette extrémité est celle qui est du côté par lequel les ribosomes arrivent, le long de l'ARNm. Pourtant, les PNA raccourcis en C-terminal sont aussi efficaces que ceux raccourcis en N-terminal pour stopper les ribosomes. Le PNA 11-mer, raccourci de 5 bases en N-terminal et de 4 bases en C-terminal, inhibe l'expression d'IGF1R- β dans les cellules DU145 de manière aussi efficace que le PNA 959. La séquence centrale TCTCTTTC, commune à tous les PNA étudiés, serait suffisante pour la formation de structures complexes de type triplexes avec l'ARN (observations à partir des expériences de gels retard et de dénaturation thermiques) et pour l'arrêt de l'élongation de la traduction. Cette séquence est riche en thymines (5 thymines sur 8 bases au total), nécessaires pour la formation des liaisons Hoogsteen à pH neutre, et comporte trois cytosines non contiguës. La présence de cytosines au sein de la séquence de thymines n'est donc pas un obstacle à la formation des triplexes. Le pKa des cytosines est de 4,4 et celles-ci ne sont donc en principe pas protonnées à pH 7. Cependant, une éventuelle protonation des cytosines ne peut être exclue, même à pH7. Le triplexe serait alors formé à la fois par les triplets T.AT et C⁺.GC. De plus, la stabilité d'un triplexe impliquant des cytosines, est plus élevée dans le cas où les cytosines ne sont pas adjacentes (Roberts & Crothers 1996). Les trois cytosines présentes dans la séquence centrale de nos PNA ne sont pas contiguës et leur protonation pourrait augmenter la stabilité du triplexe formé entre les PNA et l'ARN. Il serait donc intéressant de mesurer la protonation des cytosines dans les complexes formés par nos PNA.

Mécanisme d'action des PNA 959 et C-13

Le mécanisme d'action du PNA 959 dans les cellules ne fait pas intervenir la dégradation de l'ARNm de l'IGF1R (Lecosnier et al. 2011). L'inhibition de la traduction pourrait résulter de la relocalisation du transcrit dans des compartiments subcellulaires répresseurs ou de l'inhibition de la traduction. L'expression de la protéine tronquée dans les cellules serait la preuve d'un mécanisme d'inhibition au niveau de l'élongation de la traduction. Toutefois, l'absence de détection de cette protéine tronquée n'exclue pas un mécanisme d'arrêt de l'élongation et pourrait résulter d'une dégradation successive à sa

production, ou d'un mécanisme d'élongation de la traduction ne générant pas une quantité suffisante de protéine tronquée. On pourrait imaginer par exemple un mécanisme selon lequel les ribosomes s'accumulent entre l'AUG et le site de fixation du PNA, et ne se décrochent pas de l'ARN. Dans ce cas, la plupart des ribosomes n'auraient pas traduit l'ARN jusqu'au site de fixation du PNA et des protéines tronquées plus courtes que la taille attendue seraient éventuellement produites en faibles quantités. L'investigation du mécanisme impliqué dans l'inhibition de l'IGF1R- β est donc à poursuivre.

Nous avons choisi de sélectionner le PNA C-13 pour la conjugaison avec un CPP, afin d'augmenter la pénétration cellulaire et inhiber l'IGF1R- β dans des cellules non électroporées. La répartition de la séquence du PNA C-13 sur les exons 14 et 15 est différente de celle du PNA 959 (voir Tableau 4). En effet, le PNA C-13 ne contient que 2 bases (au lieu de 6 pour le PNA 959) complémentaires de l'exon 15. Il pourrait donc se fixer sur l'ADN et/ou le pré-ARNm, et inhiber la transcription et/ou l'épissage de l'IGF1R. Il sera donc important de regarder, par des expériences de PCR quantitatives, si l'ARNm d'IGF1R est inhibé dans les cellules DU145 transfectées avec ce PNA.

Spécificité du PNA 13-mer

L'utilisation d'oligonucléotides 13-mer en cellules pose évidemment la question de la spécificité de ciblage de ces molécules. En effet, une séquence cible de 13 bases sera présente en plusieurs copies dans le transcriptome et la fixation du PNA à cette séquence complémentaire pourra potentiellement conduire à l'inhibition d'autres protéines que celle ciblée. Il a été montré que le PNA 17-mer ne possède pas de cible secondaire 100% complémentaire sur le transcriptome humain. Une recherche des cibles secondaires présentes dans le transcriptome humain pour le PNA C-13 a été réalisée avec l'algorithme BLAST et la base de donnée RefSeq RNA de NCBI. Trois cibles secondaires ont été trouvées pour ce PNA, avec 100% de complémentarité sur les 13 bases. Il s'agit des gènes TEFM (Transcription Elongation Factor, Mitochondrial), CARD6 (Caspase Recruitment Domain Family, member 6) et VGLL3 (Vestigial like 3). Dans ces trois cibles, la séquence complémentaire est située dans la séquence codante. Les critères requis pour une inhibition de l'élongation de la traduction sont complexes, des facteurs tels que la vitesse de traduction, la localisation de structures secondaires sur l'ARN ou l'interactions avec des protéines et/ou ARN au niveau de la séquence cible pouvant influencer l'efficacité du PNA. La fixation du PNA sur ces cibles secondaires n'induit donc pas forcément leur inhibition. Des analyses protéomiques ont montré que des LNA de 8 bases dirigés contre la région seed d'une famille de miARN sont

spécifiques *in vivo* (Obad et al. 2011). Néanmoins il sera important de rechercher une modification de l'expression de ces protéines dans les cellules traitées avec le PNA.

Les PNA semblent donc uniques pour former des structures de type triplexes partiels avec leurs cibles ARN polypuriques et inhiber l'élongation de la traduction *in vitro* et *in cellulo*.

Chapitre II : Internalisation cellulaire des PNA

Notre objectif a été d'étudier l'internalisation cellulaire des PNA conduite par le CPP (R/W)⁹. Cette étude permettra notamment de rechercher un transporteur efficace pour le PNA C-13 dirigé contre l'IGF1R. L'IGF1R est un gène endogène et par conséquent la mise en évidence de l'inhibition de sa traduction dans les cellules humaines doit être réalisée par analyse des protéines par western blot. Nous avons choisi de construire un système cellulaire stable, rapporteur de l'internalisation de différents conjugués PNA-CPP. Les cellules DU145 ont été transfectées avec le plasmide pIGF1R-RLuc. Ce plasmide permet l'expression, à partir d'un promoteur CMV, d'une protéine de fusion entre l'IGF1R et la luciférase *Renilla reniformis* (RLuc). Pour l'établissement de cette lignée stable, les cellules ont été transfectées par ce plasmide, puis cultivées en présence de néomycine pour sélectionner les clones exprimant stablement le gène de fusion IGF1R-RLuc. Aucun clone exprimant stablement la luciférase n'a pu être obtenu avec ce plasmide.

Nous avons donc utilisé la lignée HeLa 1002 comme système cellulaire rapporteur de l'activité biologique des PNA AS1 et AS2 dirigés contre la séquence PPT (description page 111), qui constitue un outil simplifiant la détermination de l'efficacité des conjugués PNA-CPP pour inhiber la traduction, successivement à leur internalisation dans le bon compartiment cellulaire. Les PNA AS1 et AS2 ont donc été conjugués au CPP, ainsi qu'à un fluorophore afin de visualiser l'internalisation cellulaire par microscopie de fluorescence et quantifier la fluorescence associée aux cellules par cytométrie en flux. Il a été montré que les observations microscopiques de la localisation intracellulaire de conjugués PNA-CPP ne sont pas toujours en adéquation avec les activités biologiques obtenues (Koller et al. 2011). Pour cette raison, il est nécessaire d'associer une mesure d'activité biologique aux études de microscopie de fluorescence. La lignée cellulaire HeLa 1002 permet à la fois de déterminer l'activité biologique de nos conjugués par mesure de l'activité luciférase, et d'observer leur localisation subcellulaire en microscopie.

II. 1. Internalisation des PNA dirigés contre la séquence PPT dans les cellules HeLa 1002 par le CPP (R/W)9

1. 1. Conjugués PNA-CPP

Les PNA AS1 et AS2 ont été conjugués à leur extrémité N-terminale au CPP (R/W)9 (RRWRRRWR) par deux types de liaisons covalentes : un pont disulfure (clivable en milieu réducteur) et une liaison thiol-maléimide (non clivable). Les conjugués désignés simplement par le nom du CPP et le nom du PNA correspondent à une liaison disulfide. Dans le cas où le CPP est relié au PNA AS1 ou AS2 par liaison thiol-maléimide, les conjugués sont dénommés (R/W)9-AS1(mal) et (R/W)9-AS2(mal), respectivement.

Le PNA AS2 a également été conjugué au CPP (K/W)9 (KKWWKKWKK), qui correspond au CPP (R/W)9 avec des lysines à la place des arginines. Ce conjugué est nommé (K/W)9-AS2.

Les conjugués ont également été couplés à des fluorophores pour le suivi de leur localisation intracellulaire et pour la quantification de l'internalisation cellulaire par cytométrie en flux. Deux fluorophores ont été utilisés, le Texas Red (TR) et la Carboxytétraméthylrhodamine (TAMRA). Le TR a été choisi en raison de sa photostabilité en fonction du pH (Ji et al. 2000), qui est supérieure à celle de la rhodamine et de la fluorescéine (piercenet.com). Ceci permet de limiter les biais dans l'analyse, notamment lorsque le conjugué transite dans les vésicules acides cytoplasmiques (endosomes et lysosomes). La TAMRA a été utilisée dans les études de PCI, pour ses qualités de photosensibilisateur (Gillmeister et al. 2011; Bøe et al. 2011). Ces deux fluorophores ont été greffés sur le PNA et non sur le CPP, le PNA étant l'entité la plus stable vis-à-vis des protéases (durée de vie de l'ordre de la semaine contre quelques heures pour le peptide). De plus, si le pont disulfure est clivé dans le cytosol, il est préférable de suivre la molécule bioactive plutôt que le transporteur. Les conjugués fluorescents résultants sont désignés de la manière suivante : 'nom du CPP-nom du PNA-TR ou TAMRA'.

1. 2. Etude de l'internalisation du PNA AS2 par les peptides (R/W)9 et (K/W)9

Le PNA AS2 inhibe la traduction de la luciférase de manière légèrement plus efficace que le PNA AS1 (environ 70% pour l'AS2 contre 60% pour l'AS1), dans les cellules HeLa 1002 perméabilisées avec la SLO (Boutimah-Hamoudi et al. 2007). C'est pourquoi nous avons choisi de commencer nos études avec ce PNA.

a) Internalisation libre

Tout d'abord, des études d'activité biologique ont été réalisées après internalisation libre du conjugué (R/W)9-AS2 dans les cellules HeLa 1002. Si le conjugué permet l'internalisation du PNA AS2 dans le cytoplasme des cellules sans altérer son activité, une inhibition de l'initiation de la traduction de la luciférase sera observée. Les cellules ont été traitées pendant 4h par des concentrations croissantes de conjugué (0,5 à 5 μ M), puis cultivées pendant 24 heures supplémentaires et de la doxycycline est ajoutée afin d'induire l'expression des gènes rapporteurs. Après 24 heures de culture en présence de la doxycycline, l'activité de la luciférase est déterminée, par mesure de la bioluminescence avec un spectrofluorimètre. Malgré l'optimisation de nombreux paramètres, aucune inhibition de la luciférase n'a été obtenue. Les paramètres ayant fait l'objet de modifications sont les suivants : nombre de cellulesensemencées au début de l'expérience (1 000 à 10 000 cellules/puits), temps de culture entre l'induction de l'expression de la luciférase et la mesure (24h, 48h et 72h), concentration en doxycycline (0,1-0,5-1 μ g/mL), traitement des cellules en suspension (augmentation de la surface membranaire disponible).

Différentes hypothèses étaient alors envisageables pour expliquer ce manque d'activité biologique après pénétration libre du conjugué (R/W)9-AS2 dans ces cellules. La première possibilité est que le couplage au CPP n'ait pas permis l'internalisation du PNA, ou que de trop faibles quantités soient internalisées. Le couplage du CPP pourrait au contraire provoquer l'internalisation du PNA, mais qu'il altère l'activité du PNA. On peut imaginer par exemple que la présence du CPP sur le PNA modifie son interaction avec la cible. Enfin, une dernière possibilité est que le conjugué soit internalisé mais pas dans le compartiment subcellulaire où se trouve la cible. Dans notre système, la cible est l'ARNm de la luciférase, et se trouve donc

dans le cytoplasme. Si le conjugué est internalisé par endocytose, une séquestration dans les endosomes est probable.

b) Internalisation assistée par la chloroquine et la PCI

Article : Cell Delivery of Antisense Peptide Nucleic Acids (PNAs) by the Small Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptide (R/W)9

Soumis à The FASEB Journal.

Objectifs

Nous avons réalisé une étude du mécanisme d'internalisation du conjugué (R/W)9-AS2. Le conjugué (R/W)9-AS2-TR, comportant une molécule de Texas Red greffée sur le PNA, a été utilisé pour étudier la localisation subcellulaire en microscopie de fluorescence et quantifier cette internalisation dans les cellules HeLa 1002. Nous nous sommes intéressés à deux approches pour induire la libération des conjugués dans le cytoplasme des cellules : une approche chimique (co-traitement avec la chloroquine) et une approche photochimique.

La tétraméthylrhodamine (TAMRA) a récemment été identifiée comme photosensibilisateur, capable d'induire la PCI dans le cadre de l'étude de l'internalisation de conjugués TAMRA-TAT-GFP. L'irradiation des cellules au microscope avec un filtre rhodamine provoque la relocalisation des conjugués des endosomes vers le cytosol (Gillmeister et al. 2011). Une autre étude récente rapporte la libération dans le cytosol ainsi que l'activité biologique de conjugués TAMRA-PNA-NLS après irradiation des cellules à 546 nm (Bøe et al. 2011). Une inhibition de 90% de la cible du PNA est observée avec 2 μM de conjugué et 9 min d'irradiation à 11,5 mW/cm^2 . Ces deux études constituent une approche novatrice de PCI, le photosensibilisateur étant covalentement lié au PNA ou au CPP. L'avantage par rapport à une approche de PCI conventionnelle (co-traitement des cellules avec la molécule bioactive et un agent photosensibilisateur type phthalocyanine d'aluminium disulfonate) serait une diminution potentielle de la toxicité générée par les dommages oxydatifs sur les membranes cellulaires. En effet, l'attachement covalent du photosensibilisateur sur la molécule active pourrait restreindre les dommages photo-induits aux structures cellulaires renfermant la molécule d'intérêt et ainsi diminuer la toxicité non

spécifique. De plus, un photosensibilisateur tel que la TAMRA, moins puissant que les photosensibilisateurs classiques (phthalocyanine d'aluminium disulfonate et tétraphénylporphyrine disulfonate) produirait moins de ROS et serait probablement moins toxique pour les cellules. L'efficacité de la TAMRA pour induire la photo-libération de PNA a été observée également dans notre équipe, dans le cadre de l'étude de l'internalisation de conjugués Flavine-PNA-TAMRA (Marlin et al. 2012) (voir article en Annexe 2). Nous avons voulu étudier l'efficacité de la TAMRA pour l'internalisation photochimique de notre conjugué (R/W)9-AS2. Pour cela, les cellules HeLa 1002 ont été traitées avec le conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA et les effets de l'irradiation à 545 nm sur la localisation subcellulaire et l'activité biologique ont été étudiés.

Résumé

Nous avons montré dans cet article que le couplage du CPP (R/W)9 sur le PNA AS2 (nommé ASPNA ici) ne modifie pas son activité dans les cellules HeLa 1002 perméabilisées avec la SLO. De plus, le conjugué (R/W)9-AS2-TR (nommé ici (R/W)9-ASPNA-TR) est internalisé dans les cellules HeLa 1002 et cette internalisation atteint un maximum dès 2h d'incubation. Le marquage vésiculaire observé dans les cellules vivantes en microscopie de fluorescence et l'inhibition de l'internalisation dans des conditions de déplétion énergétique (incubation à 4°C ou en présence d'inhibiteurs d'ATP) suggèrent une internalisation par endocytose. Des études de colocalisations avec différents marqueurs d'endocytose ont montré qu'au moins trois voies d'endocytose semblent être impliquées dans l'internalisation du conjugué : la voie dépendante de la clathrine, la voie cavéolaire et la macropinocytose. Le co-traitement des cellules avec le conjugué et la chloroquine (CQ) à 150 µM, conduit à une augmentation de la taille des vésicules d'endocytose, et donc à un échappement possible du conjugué des endosomes vers le cytoplasme. En effet, la détermination de l'activité biologique en présence de cette molécule lysosomotropique met en évidence une inhibition de l'activité luciférase de 70% à 1,5 µM de conjugué. La quantification par cytométrie en flux de la fluorescence du Texas Red, a montré que la CQ augmente également la quantité de conjugué internalisé.

La comparaison d'efficacité entre les conjugués comportant le PNA AS2 (ASPNA) conjugué au CPP (R/W)9 par une liaison disulfure ou thiol-maléimide a montré que le conjugué maléimide (R/W)9-AS2(mal) est légèrement moins actif pour inhiber l'activité luciférase dans les cellules HeLa 1002 perméabilisées. En revanche, une activité biologique

légèrement plus importante est observée pour ce conjugué maléimide en pénétration libre par rapport à l'activité obtenue pour le conjugué comportant un pont disulfure.

Nous avons également montré que le PNA AS2, conjugué à l'analogue (K/W)9, comportant des lysines à la place des arginines, est six fois moins internalisé que le conjugué (R/W)9-AS2-TR. Aucune activité biologique n'a été mesurée pour ce conjugué à 1,5 μ M, même en présence de CQ. La quantification de l'internalisation des deux conjugués dans des cellules CHO 745 (déficientes en héparanes sulfates et chondroïtines sulfates) a mis en évidence l'interaction avec les molécules membranaires de glycosaminoglycanes.

Enfin, une internalisation photochimique (PCI) a été observée avec le conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA (nommé ici (R/W)9-ASPNA-TAMRA), dans lequel la rhodamine est l'agent photosensibilisateur. L'irradiation des cellules à 545 nm provoque la redistribution de la fluorescence associée au conjugué, des endosomes vers le cytoplasme et le noyau. Malgré la grande efficacité de la PCI, aucune inhibition de l'activité luciférase n'a été observée après irradiation à 545 nm des cellules traitées par le conjugué. En revanche, la luciférase est inhibée après traitement des cellules par le conjugué (R/W)9-AS2, dans le cas d'une PCI induite par la phthalocyanine d'aluminium. Dans ces mêmes conditions, le conjugué marqué par la TAMRA n'est pas actif. Cette étude apporte un questionnement sur l'utilisation de la TAMRA comme photosensibilisateur efficace pour l'activité biologique des PNA.

Article

soumis à the Faseb Journal

Cell Delivery of Antisense Peptide Nucleic Acids (PNAs) by the Small Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptide (R/W)9.

Céline Cordier^{1,2,3}, Fatima Boutimah^{1,2,3}, Mathilde Bourdeloux^{1,2,3}, Florian Dupuy^{1,2,3}, Elisabeth Met^{1,2,3}, Stéphanie Bonneau^{4,5}, Christine Vever-Bizet^{4,5}, Carine Giovannangeli^{1,2,3} Gérard Chassaing^{6,7,8}, Fabienne Burlina^{6,7,8}, and Tula Ester Saison-Behmoaras^{1,2,3,*}

¹Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire des Régulations et Dynamique des Génomes, 43 rue Cuvier, 75005, Paris, France, ²INSERM, U565, France, ³CNRS, UMR 7196, France, ⁴UPMC-Univ Paris 06, Laboratoire Jean Perrin, Université P. et M. Curie 4, Place Jussieu, 75005 Paris, France, ⁵CNRS, FRE 3231, France, ⁶UPMC-Univ Paris 06, Laboratoire des BioMolécules, Université P. et M. Curie 4, Place Jussieu, 75005 Paris, France, ⁷CNRS, UMR 7203, France, ⁸ENS, UMR 7203, Département de Chimie, Ecole Normale Supérieure, 24, Rue Lhomond 75005 Paris, France

* Corresponding author: Tula Saison-Behmoaras, Laboratoire des Régulations et Dynamique des Génomes, 43 rue Cuvier, 75005 Paris. Tel: 003140793686; Fax: 003140793705; E-mail: tula@mnhn.fr

Abstract

Peptide nucleic acids (PNAs) are very attractive antisense and anti-gene agents, but these molecules are not passively taken into cells. Arginine-rich cell-penetrating peptides have been used to enhance delivery of charge-neutral PNAs. Here, using a functional cell assay and fluorescent-based methods, we investigated cell uptake and antisense activity of a PNA that targets the HIV-1 poly-purine tract sequence delivered using the arginine-rich (R/W)⁹ peptide (RRWRRRWR). PNA conjugated to the peptide through disulfide and maleimide linkers showed similar cell uptake characteristics and biological activities in permeabilized HeLa cells engineered to express a luciferase gene with the PPT sequence upstream of the start site. At micromolar concentrations, almost 80% inhibition of the target gene was also obtained in the presence of the endosomolytic agent chloroquine (CQ). Therefore, the nonapeptide efficiently facilitated entry of the steric blocker PNAs into eukaryotic cells. Replacement of the arginines in (R/W)⁹ with lysines inhibited cell penetration. The conjugates were efficiently released from endosomes as demonstrated based on photochemical internalization (PCI) of the fluorescent conjugate (R/W)⁹-PNA-TAMRA. In contrast to our observation in cells treated with CQ, no antisense effect was detected after PCI, highlighting the importance of performing both functional and localization analyses to validate the efficacy of a conjugate.

Key words: steric blocker, antisense, peptide nucleic acids, cell penetrating peptides, photochemical internalization

INTRODUCTION

Peptide nucleic acids (PNAs) show high sequence specificity in binding to the complementary single-stranded RNA and to single- or double-stranded DNA targets. In addition, PNAs have increased chemical stability relative to natural nucleic acids. Due to these features PNAs have exceptional potential for therapeutic applications and diagnostic use (1, 2). Despite their neutral charge, PNAs do not enter cells more readily than negatively charged oligonucleotides (3). A variety of methods have been developed to improve PNA uptake into cells, and the currently favored approach involves conjugation to cell-penetrating peptides (CPPs) (4–6). Many groups have attempted to understand what makes a CPP a good PNA carrier, but there are discrepancies in the results reported most likely resulting from the diversity of the used cell systems, targets (nuclear or not), types of conjugates (linkers, linker localization, peptides, PNA length), and the methods for evaluating CPP efficacy (assays for biological function (7–12) versus fluorescent labels that indicate localization). The detailed mechanism of how the CPP-cargo conjugates enter the cell remains unclear and recent data suggest an energy-dependent endocytic pathway (13). Cationic CPPs interact with cell glycosaminoglycans, but the mechanisms of cell uptake after cell surface binding are diverse and in some cases controversial. It is clear that the cell entry mechanism strongly depends on the nature and size of the CPP and also on the type of cargo. Recently, we demonstrated that two steric-blocker tridecamer PNAs that target the HIV-1 poly-purine tract (PPT) sequence induce a sequence-specific and dose-dependent antisense inhibition of luciferase activity in streptolysin-*O* (SLO)-permeabilized HeLa cells engineered to express the luciferase gene with the PPT sequence upstream of the luciferase gene start site (14).

Here, we used the same cell system and fluorescence-based methods to determine the factors involved in the cell uptake efficiency and antisense activity of the anti-PPT PNA H-CCCCCTTTTCT-Lys (14) conjugated to the (R/W)₉ nonapeptide (H-RRWRRRWR-NH₂), which is one of the most efficient among the CPPs tested previously (15, 16). The (R/W)₉-PNA cell uptake and antisense activities were not strongly affected by whether a disulfide or a maleimide linker was used to conjugate (R/W)₉ to the PNA, whereas substitution of the arginine residues in (R/W)₉ by lysines led to a six-fold decrease in cell uptake of the (K/W)₉-PNA conjugate compared to (R/W)₉-PNA. Cell uptake in the presence

of heparin confirmed that the arginine residues confer an advantage to the conjugate. Moreover, use of mutant CHO cells in which proteoglycan synthesis is deficient showed that glycosaminoglycans are implicated in cell surface binding and internalization of (R/W)9-PNA and (K/W)9-PNA conjugates. We then demonstrated that several pinocytic pathways are involved in (R/W)9-PNA internalization in endosomal/lysosomal vesicles. Quantification of luciferase activity in the presence of the lysosomotropic agent chloroquine (CQ) (17) indicated that the PNA antisense effect in CQ-treated cells was comparable to what observed in SLO-permeabilized cells. After photochemical internalization (PCI) (18, 19) of (R/W)9-PNA labeled with the TAMRA photosensitizer (20, 21), TAMRA fluorescence was observed in the cytosol and nucleus, but no luciferase inhibition was observed. These experiments showed that endosomal escape and efficient cytosolic and nuclear delivery of conjugates are not the only prerequisite for intracellular antisense activity.

MATERIALS AND METHODS

PNA oligomers and PNA-CPP conjugates

The H-CCCCCCTTTTCT-Lys anti-PPT PNA (ASPNA), the H-TTTTCCTCTCCCT-Lys scrambled PNA (SCRPNNA), and the PNA-CPP conjugates, with or without Texas red (TR) or 5-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA), were from Panagene (Korea).

Cell culture

HeLa cells were previously engineered to stably express the firefly luciferase (*Photinus pyralis*) and the *gfp* reporter genes under the control of a bidirectional doxycycline-inducible CMV promoter (14). The PPT sequence (5'-AAAAGAAAAGGGGGGA-3') is present upstream of the AUG translation start site of the *luc* gene and the mutated sequence 5'-AAAAGAAGGGGAGGAA-3' is present upstream of start site of the *gfp* gene, allowing us to test the sequence-specificity of anti-PPT molecules (14). These PPT/HeLa cells and the breast adenocarcinoma cell line MCF-7 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were grown in DMEM medium (Gibco, Life Technologies) supplemented with 7% fetal calf serum (FCS). The Jurkat (human T lymphocytes) and the DU145 (human prostate cancer cells) cell lines (American Type Culture Collection) were grown in RPMI medium (Gibco, Life Technologies) supplemented with 10% FCS. The human bone osteosarcoma U-2OS cell line was cultured in McCoy's 5A medium and the Chinese hamster ovary (CHO) cell lines (CHO-K1 and CHO-745) in DMEM F12 medium (Gibco, Life Technologies) with 10% FCS. All cell lines were grown at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

Reversible permeabilization and luciferase assay

SLO (Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Mainz, Germany) was used to reversibly permeabilize PPT/HeLa cells as previously described (14). Cells (2.6x10⁵ cells/well in 96-well plates) were washed twice and resuspended in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) with calcium and magnesium (Gibco, Life Technologies). Cells were permeabilized at 37 °C for 15 min by addition of an optimized amount of SLO (30-60 ng/well) to reach 80-95% permeabilization in the presence of the indicated concentrations of naked or conjugated PNAs. Resealing was achieved by addition of 225 µl DMEM

supplemented with 10% FCS, and cells were further incubated at 37 °C for 20 min. Cells were then transferred to another 96-well plate (3×10^4 cells/well) and incubated at 37°C for 1 h. Finally, expression from the *luc* and *gfp* genes was induced by addition of 1 µg/mL doxycycline (Sigma, France) and cultured for 24 h. Cells were then lysed in Passive Lysis Buffer (Promega, France) and luciferase activity was quantified with a spectrofluorimeter (Wallac Victor 2 Multi-label Counter, Perkin Elmer, USA) using the Luciferase Assay System (Promega). Background was subtracted from the luminescence readings. Results were normalized to the lysate protein concentration (determined with the Bradford protein assay, Bio-Rad, France); results are presented as relative light units (RLU/µg protein) and are expressed as the percentage relative to the luminescence obtained in untreated cells. Each data point is the mean of three replicates in at least four separate experiments.

Free uptake of conjugated PNAs

PPT/HeLa cells were seeded (9.5×10^3 cells/well) in 96-well plates and grown overnight. Cells were washed with PBS (Gibco, Life Technologies) and then incubated with PNAs or peptide-PNA conjugates in the presence or absence of 150 µM chloroquine (Sigma) in 50 µL of serum-free Opti-MEM medium or in Opti-MEM with 7% FCS (Gibco, Life Technologies) for 4 h. Luciferase expression was induced by addition of 150 µL doxycycline (1 µg/mL) in DMEM medium, and then cells were cultured for another 24 h. For cell viability assays, cells were treated in the same way, and viability was evaluated with the CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Fluorescence microscopy of live cells

In all experiments, 8-well chambered cover glass microslides (IBIDI, Biovalley, France) were used. Cells (4×10^4 cells/well) were seeded in the chambers and cultured overnight at 37 °C. Cells were washed with HBSS (Gibco) and incubated with the indicated concentrations of fluorescent conjugate or PNA in 150 µL Opti-MEM at 37 °C for indicated times. Culture medium was replaced with DMEM without phenol red (Gibco) for microscopic observation of live cells using two inverted microscopes: The first was a Leica microscope DMIRE2 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipped for epi-illumination with an Osram HXP R 120W 45C lamp and Rooper Coolsnap CCD camera. Acquisitions were made with

the Metamorph software, using a 100x oil immersion objective (numerical aperture of 1.4) and a CY3 filter (EX BP 545/30, EM BP 610/75). The second was a Zeiss Axio Observer.Z1 microscope with a structured illumination system (ApoTome) maintained in a 37 °C incubation room. Images were taken with an OrcaR2 (Hamamatsu) camera using a 63x oil immersion objective (numerical aperture of 1.4) and a 43 DsRed shift free filter (EX BP 550/25, EM BP 605/70). Acquisitions were made with the AxioVision4.8 software. Images were analyzed using the Image J software.

Fluorescence assisted cell sorting (FACS) analysis

For uptake kinetics, exponentially growing PPT/HeLa cells were plated in 48-well plates (4.0×10^4 cells/well). The next day, cells were washed with PBS and incubated with TR-labeled conjugates or naked PNAs, as described above. After incubation, cells were trypsinized (Gibco) and washed twice with PBS. Fluorescence analysis was performed with a C6 flow cytometer (Accuri) using the Cy5 channel (FL3). The background-free mean fluorescence values were calculated by subtracting the mean fluorescence of untreated cells from the obtained mean fluorescence. The error bars shown represent the standard square deviation of at least three independent experiments. Based on cell size (FSC) and granularity (SSC), only the live cell fraction was analyzed.

Uptake experiments

Energy depletion: Cells were incubated with the PNA conjugates in the presence of 10 mM sodium azide and 6 mM deoxy-D-glucose at 37 °C or at 4 °C for 1 h. Medium was discarded and replaced with DMEM without phenol red. Cells were observed with a Zeiss Axio Observer.Z1 microscope or collected for FACS analysis.

Heparin competition: Cells (4×10^4 cells/well), seeded 17 h earlier, were pre-treated with 5 µg/mL heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (Sigma) in Opti-MEM medium for 30 min. Cells were then incubated at 37 °C with 1 µM conjugate in the presence of 5 µg/ml heparin for 1 h and were washed with PBS before FACS analysis.

Chloroquine treatment: Cells in IBIDI microslides were incubated with 150 µM CQ and 1 µM TR-labeled conjugates for 4 h. Cells were then either directly analyzed by FACS or

microscopy or were cultured in fresh medium for 24 h.

Co-localization experiments: Cells (4×10^4 cell/well), seeded 17 h earlier, were incubated with 1.5 μ M (R/W)9-PNA-TR conjugate with 25 μ g/ml Alexa 488-Transferrin, 0.25 mg/mL Alexa 488-Dextran, or 10 μ g/mL Alexa 488-Cholera toxin subunit B (Life Technologies) in Opti-MEM medium at 37°C for 2 h. Control cells were not treated with PNA conjugate. Medium was replaced with DMEM without phenol red for image acquisition with a Zeiss Axio Observer.Z1 microscope. For lysosome labeling, 1 μ M Alexa 488-LysoTracker (Life Technologies) was added to cells.

Photochemical internalization experiments

PPT/HeLa cells were seeded (9.5×10^3 cells/well) in 96-well plates and grown overnight (18 to 20 h). Cells were washed with PBS and then co-incubated with the indicated concentrations of PNA or CPP-PNA-TAMRA conjugates and 5 μ M aluminium phthalocyanine in Opti-MEM medium (Gibco, Life Technologies) for 4 h. Cells were then cultured in medium containing aluminium phthalocyanine but not PNA overnight. After washing in PBS, cells were left in DMEM for 2 h. DMEM was replaced by HBSS, and cells were irradiated using a 1000 W Xenon arc lamp mounted in a lamp housing. The irradiation wavelength was selected using an interference filter centred at 650 nm with a half bandwidth of 50 nm (K65 from Balzers, Liechtenstein). The irradiation beam was focused on the sample that was homogeneously illuminated. The irradiance of the incident light was measured using a power meter (Newport). Luciferase expression was induced by addition of 1 μ g/mL doxycycline, and luciferase activity was measured 24 h later.

Statistical analyses

All the statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test and the SOFA Statistics software. Errors bars represent the standard deviation of at least three independent experiments. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

RESULTS

Disulfide- and maleimide-linked (R/W)9-PNA conjugates efficiently inhibit luciferase activity in SLO-permeabilized cells

We first evaluated the intracellular antisense activity of naked PNAs (ASPNA and SCRPNAs) and (R/W)9-PNA conjugates (see Table 1 for sequences) in SLO-permeabilized PPT/HeLa cells that contain the PPT sequence upstream of the *luciferase* gene under the control of the doxycycline-inducible CMV promoter. Naked PNAs and conjugates were introduced in SLO-permeabilized cells and luciferase activity was measured after 24 hours, as previously described (14). Unconjugated and (R/W)9-conjugated ASPNAs both inhibited luciferase activity by about 70% at 1 μ M concentration (Fig. 1), indicating that naked and (R/W)9-conjugated ASPNAs have the same ability to recognize their intracellular mRNA target and reduce gene expression. The antisense effect was target specific because a scrambled sequence (SCRPNAs) did not affect luciferase activity (Fig. 1). The nature of the linkage between the CPP and PNA did not affect strongly the conjugate efficiency: the disulfide conjugate was only slightly more efficient than the maleimide conjugate (Fig. 1).

Disulfide- and maleimide-linked (R/W)9-PNA conjugates efficiently inhibit luciferase activity when added to the cell culture medium

We then tested the ability of the different (R/W)9-PNA conjugates to inhibit luciferase activity in PPT/HeLa cells after free uptake. As our conjugates are internalized via endocytosis, these molecules must escape from endosomes to reach their cytosolic targets. Cells were incubated for 4 hours with naked or conjugated PNAs (ASPNA and SCRPNAs) in the presence or absence of 150 μ M CQ. CQ is a lysosomotropic agent that accumulates in endosomes and lysosomes and enhances the cytosolic delivery of cargoes attached to CPPs (17) in the absence of any transfection agent. Cells were allowed to grow for 24 hours. (R/W)9 and other CPPs that are disulfide-linked to their cargoes can engage in thiol/disulfide exchange reactions at the cell surface, increasing their cell association and facilitating internalization (22). We thus compared the antisense activity of disulfide (S-S) linked and stably linked maleimide (RW)9-PNA conjugates. Both showed a strong dose-dependent and sequence-specific inhibition of luciferase activity in the presence of CQ (grey bars) (Fig. 2A), although the maleimide-linked (R/W)9-PNA conjugate was slightly more efficient ($85\% \pm 4$ at 1.5 μ M) than the disulfide bond-linked conjugate ($68\% \pm 8$ at 1.5 μ M). Cell viability was

>85% for all PNA conjugates in the presence of CQ (**Fig. 2B**). This result clearly shows that the presence of a cleavable disulfide bond between (R/W)9 and PNA is not essential for cell uptake, whereas the release from endosomal- and membrane-bound compartments is crucial for the antisense activity (luciferase inhibition) by (R/W)9-PNA conjugates. Moreover, serum proteins did not have any effect on internalization or biological activity of either conjugate. (R/W)9-PNA conjugates elicited similar antisense activities when added to cells in serum-free medium or containing 7% FCS, suggesting that the conjugates do not bind to serum proteins. This is in contrast to other arginine-rich peptides that have high capacity to bind serum proteins (23).

(R/W)9-PNA conjugates are internalized via pinocytosis

Internalization of extracellular material can occur through different mechanisms including phagocytosis of large particles and pinocytosis, which can be categorized as macropinocytosis, and clathrin-dependent (CDE) and clathrin-independent (CIE) endocytosis. To study how the (R/W)9 peptide delivers PNAs inside cells, we labeled the disulfide-linked (R/W)9-ASPNA conjugate with Texas red (TR) [(R/W)9-ASPNA-TR]. The fluorescent probe was attached to the C-terminus of PNA because the (R/W)9 peptide is less stable than PNA and can be detached after disulfide bridge reduction (24). The orientations of the CPP and PNA were as before. We made all our observations in live cells as fixation procedures can cause major artefacts and modify the intracellular distribution (25). We did not use chemical inhibitors for specific endocytosis pathways because recent studies showed that they lack selectivity and may give misleading results (26).

Kinetics and energy-dependence of (R/W)9-PNA-TR internalization

First, we determined the kinetics of (R/W)9-ASPNA-TR uptake by measuring the cell-associated fluorescence by FACS after trypsin digestion. Analysis of the FACS profiles and of the mean cell fluorescence values clearly indicated a progressive uptake over 60 min after which levels reached a plateau that persisted for at least six hours (**Fig. 3A**). No uptake was observed with naked ASPNA-TR. We then examined (R/W)9-ASPNA-TR uptake under conditions of energy depletion by incubating cells at 4 °C or in the presence of the energy-depleting mixture of deoxyglucose (DOG) and sodium azide (NaN₃) for 1 hour. Quantification of internalized conjugates by FACS analysis confirmed that (R/W)9-ASPNA-TR uptake was energy dependent (**Fig. 3B**).

Endosomal release in the presence of CQ and after photochemically induced internalization

The (R/W)9-ASPNA-TR conjugate showed a punctuate distribution in the cytosol with rather small puncta that were well distributed, typical of endosomal sequestration (**Fig. 4A**, -CQ). Upon addition of 150 μ M CQ, the intensity of the TR signal inside the vesicles and the vesicle size increased over time. At 24 h, when the antisense effect was measured, in addition to punctuate structures in the cytosol, a significant and uniform fluorescence throughout the cytosol and nuclei was observed (**Fig. 4A**, +CQ). Quantification by FACS analysis clearly showed that (R/W)9-ASPNA-TR uptake was higher in the presence of CQ than in its absence (**Fig. 4B**). These qualitative and quantitative observations are in full agreement with the observed biological effects in presence of CQ (**Fig. 2**).

Endosomal release of CPP-cargo conjugates can be induced by PCI, which is based on the use of photosensitizing compounds that localize inside endosomes and disturb endosomal membranes when irradiated with visible light. We thus labeled (R/W)9-ASPNA with the photosensitizer TAMRA [(R/W)9-ASPNA-TAMRA] to assess the light-controlled release of the conjugate. In PPT/HeLa cells irradiated for approximately 2 minutes during image acquisition with the 545/30 nm filter, the TAMRA signal was redistributed from the endosomal compartment to the cytosol and nucleus (**Fig. 4C**). However, despite this very efficient endosomal release, (R/W)9-ASPNA-TAMRA did not elicit antisense effects under these conditions (data not shown). To evaluate whether the TAMRA labeling perturbed (R/W)9-ASPNA interaction with the mRNA target, we performed free uptake experiments in the presence of CQ. These experiments showed that (R/W)9-ASPNA-TAMRA induced similar inhibition of luciferase activity as (R/W)9-ASPNA-TR and was slightly less effective than (R/W)9-ASPNA (**Supplementary Fig. 1**), indicating that TAMRA does not hinder target recognition. We then used the AlPcS_{2a} photosensitizer (19) to assess whether PCI was observed with (R/W)9-ASPNA. At 1.5 μ M, (R/W)9-ASPNA induced, under appropriate irradiation conditions, 60% inhibition of luciferase activity, whereas (R/W)9-ASPNA-TAMRA was inactive (**Supplementary Fig. 2**). These results suggest that the TAMRA-labeled conjugate is sequestered in the cytosol and cannot reach the ribosomal compartment.

Involvement of clathrin-dependent endocytosis in (R/W)9-ASPNA-TR internalization

CDE is the best characterized endocytic pathway and many macromolecules are specifically taken up in clathrin-coated vesicles (27). To test whether CDE is involved in (R/W)9-ASPNA-TR internalization, we incubated PPT/HeLa cells with (R/W)9-ASPNA-TR in the

presence of Alexa Fluor 488-labeled human transferrin (hTF), which is considered to be a good CDE marker because in its iron-bound form it binds to the transferrin receptor and is taken up via CDE (28). Fluorescence microscopy analysis showed that hTF and (R/W)9-ASPNA-TR were mostly localized in the same compartments (**Fig. 5A**).

Involvement of macropinocytosis in (R/W)9-ASPNA-TR internalization

Macropinocytosis is a non-selective endocytic mechanism to internalize suspended macromolecules, particularly fluid-phase markers, such as high-molecular-weight dextran. We incubated PPT/HeLa cells with (R/W)9-ASPNA-TR in the presence of Alexa Fluor 488-labeled dextran and observed partial co-localization with (R/W)9-ASPNA-TR (**Fig. 5B**).

Involvement of clathrin-independent endocytosis in (R/W)9-ASPNA-TR internalization

The active fraction of cholera toxin is internalized by CIE from lipid rafts, which are cell membrane micro-domains enriched in cholesterol and sphingolipids (29). **Figure 5C** shows that (R/W)9-ASPNA-TR co-localized with the Alexa Fluor 488-labeled B subunit of the cholera toxin.

(R/W)9-ASPNA-TR accumulation in lysosomes

Finally, PPT/HeLa cells were co-incubated with (R/W)9-ASPNA-TR and Alexa 488-labeled LysoTracker green, a specific lysosomal dye. Co-localization analysis of all the studied vesicles revealed a strong overlapping of (R/W)9-ASPNA-TR-positive and LysoTracker-positive structures, indicating that at least part of the conjugate is targeted to lysosomes through the endo-lysosomal pathway (**Fig. 5D**). Together, these results show that macropinocytosis, CDE, and caveola-mediated endocytosis all contribute to (R/W)9-ASPNA-TR uptake and transport into lysosomes.

Replacement of (R/W)9 arginines by lysines decreases cell uptake and antisense activity of CPP-ASPNA-TR conjugates

To explore how arginine and lysine residues contribute to cell surface binding and cell uptake of CPP-PNA conjugates, we compared the activity of (R/W)9-ASPNA-TR to that of (K/W)9-ASPNA-TR, in which all the arginine residues of (R/W)9 were substituted by lysines. We incubated PPT/HeLa cells with 1 μ M (R/W)9-ASPNA-TR or 1 μ M (K/W)9-ASPNA-TR and quantified cell-bound TR fluorescence of live cells. Uptake of (K/W)9-ASPNA-TR was six-

fold lower than that of (R/W)9-ASPNA-TR (**Fig. 6A**), showing the arginine-dependence of cell uptake. Similar results were obtained in four different human cell lines (**Supplementary Fig. 3**). Consistent with this observation, (K/W)9-ASPNA-TR did not have any effect on luciferase activity under conditions where (R/W)9-ASPNA induced 70% inhibition (**Fig. 6B**). It should be emphasized that both conjugates induced equivalent inhibition of luciferase activity in SLO-permeabilized cells (**Supplementary Fig. 4**). Therefore, the lack of intracellular activity was not due to differences in the affinity for the target, but only to differences in cell uptake.

(R/W)9-ASPNA-TR endocytosis is glycosaminoglycan dependent

To investigate whether cell surface proteoglycans have a role in the different levels of uptake of (R/W)9-ASPNA and (K/W)9-ASPNA-TR, PPT/HeLa cells were incubated with TR-labeled conjugates in the presence or absence of heparin, which mimics glycosaminoglycan (GAG) moieties of cell surface proteoglycans. A three-fold decrease in (R/W)9-ASPNA-TR uptake was detected by FACS in heparin pre-treated cells in comparison to uptake into untreated cells (**Fig. 7A**). Conversely, heparin did not compete with the uptake of (K/W)9-ASPNA-TR. We also evaluated uptake into parental CHO-K1 cells and mutant CHO-745 cells, in which GAG synthesis is defective due to the lack of xylosyl transferase activity (no heparan sulfate and chondroitin sulfate) (30). The uptake of both conjugates was four-fold decreased in CHO-745 cells compared to that into parental cells (**Fig. 7B**). These results confirmed that arginines confer an uptake advantage to the conjugate and show that electrostatic interactions between negatively charged GAGs at the cell surface and positively charged conjugates are involved in the endocytosis of both (R/W)9-ASPNA-TR and (K/W)9-ASPNA-TR. Moreover, they suggest that lysine- and arginine-rich conjugates have different affinities for GAGs or interact with different cell surface GAGs.

DISCUSSION

In this work we showed, using a functional cell assay and fluorescence-based methods, that internalization of (R/W)9-PNA conjugates is energy-dependent and involves both macropinocytosis and clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. Endosomal release of such conjugates for efficient antisense PNA activity was obtained by incubation with chloroquine.

First we investigated the affinity for the mRNA target of CPP-ASPNA conjugates with either a disulfide bridge or a maleimide linker by measuring their inhibition of luciferase activity in SLO-permeabilized PPT/HeLa cells. We observed that positively charged CPPs contribute to the stabilization of RNA-PNA complexes if they are attached to the cargo when they reach the target. The disulfide bridge is used as linker to conjugate the PNA to a CPP because PNAs, like other polymers, can be easily functionalized with a thiol. The disulfide linkage is expected to be cleaved by the action of cytoplasmic glutathione to release a free PNA into the cell. Recently, Aubry et al. (22) showed that (R/W)9 disulfide-conjugated to a peptidic cargo can be cross-linked by cell-surface thiol proteins. In addition, they reported higher cell association and enhanced cell entry for (R/W)9 harbouring oxidized or reduced Cys residues compared to the free Cys version. Our results show that the linker does not affect the antisense activity of the conjugate. Indeed, stably linked (R/W)9-PNA complexes were only slightly less active than disulfide-linked conjugates. Similar results were obtained also in free uptake experiments using 150 μ M chloroquine. It is possible that the CPP does not increase PNA affinity towards the target. Alternatively, the rate of intracellular degradation of (R/W)9 could be comparable in both maleimide- and disulfide-linked conjugates.

By investigating the co-localization of (R/W)9-PNA complexes with Alexa Fluor488-labeled dextran (marker of macropinocytosis), hTF (a CDE marker), and cholera toxin subunit B (a CIE marker) we showed that macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, and caveola-mediated endocytosis all contribute to (R/W)9-ASPNA-TR uptake. This indicates that the different pinocytosis pathways are not mutually exclusive, as was previously shown for TGF- β internalization (31). After internalization using one of the pinocytosis pathways, the conjugates are observed in the endosomal/lysosomal compartments, as indicated by co-localization with LysoTracker green (a dye used to label lysosomes in live cells) and as previously shown for other CPP-linked cargoes (32–34, 25, 35). Conjugates must escape from

these compartments to elicit the PNA anti-sense effect in the cytosol. Our microscopy images show that endo/lysosomes of cells transfected in the presence of CQ are larger than in control cells without CQ and that the conjugate is concomitantly liberated in the cytoplasm. Most probably, CQ accumulates in PPT/HeLa cells with a cell-to-medium concentration gradient of about 100 as it was described for human hepatocarcinoma cells (17). CQ unprotonated amines can absorb protons that are pumped into acidic vesicles, resulting in more protons being pumped in and leading to increased influx of Cl⁻ ions and water and finally to endosome swelling and rupture with the release of the conjugate in the cytoplasm. The antisense activity of the (R/W)₉-ASPNA conjugate measured 24 hours after CQ treatment was identical to the activity of naked ASPNA in SLO-permeabilized cells, suggesting that endosomal escape is very efficient after CQ treatment. We observed very good correlations among cell uptake quantified by FACS analysis, cellular localization shown by fluorescence microscopy studies, and biological activity of the (R/W)₉-ASPNA conjugate.

Entrapment within the endosome/lysosome compartment after endocytosis remains a limiting factor to effective use of PNA-based agents. It has been reported that at high concentrations (> 3 μM) (R-Ahx-R)₄-PNA and R₆Pen-PNA conjugates induce splicing redirection in PPT/HeLa cells in the absence of endosomolytic agents; however the low efficacy and the toxicity due to the high concentration of arginine residues limit the use of these conjugates (36). Gait's group attempted to improve the efficacy of (R-Ahx-R)₄-PNA conjugates by synthesizing branched, arginine-rich dendrimer conjugates. However, 8-Arg branched peptide-PNA conjugates showed poor activity compared to the linear conjugate (10). An additional approach to disrupt endosomes is PCI, based on the use of phtalocyanine or porphyrin derivatives that localize inside endosomes and disturb endosomal membranes only at the illuminated sites (18). Using phtalocyanine as photosensitizer, Shiraishi and Nielsen showed that PCI treatment increases the antisense effect of a number of PNA-cationic peptide conjugates in HeLa cells (19). More recently, similar photo-endosomolytic effects were achieved with CPPs labeled with TAMRA (21, 20). Here, the (R/W)₉-ASPNA-TAMRA conjugate efficiently escaped from endosomes upon light induction, but no antisense effect was detected possibly because this conjugate is sequestered in the cytosol. This indicates that the mild photosensitizer TAMRA is not appropriate for (R/W)₉-PNA conjugates and that more effective photosensitizers, such as phtalocyanine or porphyrin derivatives, should be tested in the future.

We then investigated the role of the arginine residues of (R/W)9 in the cell uptake and biological activity of the conjugates. The cell uptake of the (K/W)9-ASPNA variant, in which all arginine were mutated in lysines, was six-fold decreased compared to (R/W)9-ASPNA in PPT/HeLa cells and four other cell lines, indicating that the arginine residues confer a cell uptake advantage to (R/W)9. Moreover, the strong decrease in (R/W)9-ASPNA and (K/W)9-ASPNA cell uptake into CHO-745 cells, in which proteoglycan synthesis is defective due to the lack of xylosyl transferase activity, shows that glycosaminoglycans are implicated in the cell surface binding and internalization of both conjugates. However, upon competition with heparin, only the cell uptake of (R/W)9-ASPNA conjugate was reduced, whereas uptake of (K/W)9-ASPNA remained unchanged. These results suggest different interactions of the arginine-rich and lysine-rich conjugates with GAGs. The arginine-rich (R/W)9-ASPNA conjugate may interact more strongly with glypicans (heparan sulfate proteoglycans) than lysine-rich (K/W)9-ASPNA conjugate. This difference could be attributed to the structure of the guanidium head-group on the arginine residues that may allow formation of stable bidentate hydrogen bonds with highly negatively charged glycosaminoglycan polysaccharides, whereas only a single hydrogen bond is possible with the ammonium group of lysine. Similarly, Esbjörner's group showed, using parental and mutated CHO cells, that the cell uptake of penetratin and of the arginine-rich variant PenArg is more efficient than that of the lysine-substituted PenLys (37). They also demonstrated that penetratin and the arginine-rich variant have higher binding affinity for plasma membrane vesicles than PenLys (38). It was recently shown for both penetratin and (R/W)9 that not only basic residues but also tryptophan residues are involved in the recruitment of cell-surface GAGs (39).

In conclusion, in the present study we showed that the nonapeptide (R/W)9, which contains six arginine and three tryptophan residues, is a very efficient CPP to vehicle PNAs into eukaryotic cells. Release of the conjugate from endocytic vesicles with CQ or with PCI resulted in the same biological efficacy as observed in SLO-permeabilized cells. We also explored the possibility of delivery of a multifunctional molecule in which the (R/W)9-PNA complex was conjugated to the photosensitizer TAMRA for light induced endocytic escape. Despite a very efficient endosomal release, no biological effect was observed, highlighting the importance of performing both functional and fluorescence-based approaches to validate the efficacy of a conjugate.

LEGENDS TO FIGURES and TABLES:

Table 1: Unconjugated and conjugated PNA molecules used in this study.

PNA and peptide sequences are written from the N to the C terminus. PNA, peptide nucleic acid; mal, maleimide; TAMRA, 5'-carboxytetramethylrhodamine; TR, Texas red.

Figure 1: Inhibition of luciferase activity in permeabilized PPT/HeLa cells.

Cells were reversibly permeabilized using SLO in the presence of 1.5 μ M (final concentration) of naked or (R/W)9-conjugated PNAs. Luciferase activity was measured 24 h later and is expressed as luminescence/mg of protein (arbitrary units, a.u.). Percentages are relative to activity in untreated cells. The values represent the mean \pm SD of at least four independent experiments. ASPNA, antisense PNA; SCRPNAs, scramble PNA; S-S, disulfide linker; mal, maleimide linker.

Figure 2: Free cellular uptake of the different conjugates.

(A) Relative luciferase activity in PPT/HeLa cells incubated with naked or (R/W)9-conjugated antisense PNAs (ASPNA) at the indicated concentrations with (grey bars) or without (white bars) 150 μ M chloroquine (CQ) for 4 h in serum-free or 7% FCS Opti-MEM medium, as indicated. Luciferase activity was measured 24 h after addition of doxycycline and expressed as luminescence/mg of protein. Percentages are relative to luciferase activity in untreated cells. (B) Cell viability was analyzed using the MTS cell proliferation assay, and values were normalized to the average value of the untreated sample. Values are the mean \pm SD of at least three independent experiments.

Figure 3: Kinetics and energy-dependence of (R/W)9-ASPNA-TR uptake into PPT/HeLa cells.

(A) Cells were incubated with 1 μ M (R/W)9-ASPNA-TR or with 1 μ M ASPNA-TR for the indicated times. Fluorescence was measured by FACS, and data shown are the mean \pm SD of three independent experiments. (B) PPT/HeLa cells were incubated with 1 μ M (R/W)9-ASPNA-TR at 37 $^{\circ}$ C or at 4 $^{\circ}$ C for 60 min or with 1 μ M (R/W)9-ASPNA-TR and a mix of 10 mM sodium azide (NaN_3) and 6 mM deoxyglucose (DOG) to deplete cellular ATP at 37 $^{\circ}$ for 60 min. The histogram shows the fluorescence values (means \pm SD of four independent

experiments) measured by FACS analysis.

Figure 4: Effects of the chloroquine and light-induced endosomal escape on (R/W)9-ASPNA internalization.

(A) PPT/HeLa cells were incubated with 1 μ M (R/W)9-ASPNA-TR with (+CQ) or without chloroquine (-CQ) for 4 or 24 h prior to microscopic observation. Images are the projection of all z-stacked signals (0.2 μ m between each image). Light field (upper panels) and fluorescent images (lower panels) are shown. Scale bar: 30 μ m. (B) Representative FACS data of cell uptake (TR fluorescence) of ASPNA-TR in the presence of CQ (red curve) or the absence (black curve) and of (R/W)9-ASPNA-TR in the presence of CQ (yellow curve) or the absence (blue curve). Fluorescence quantification (mean \pm SD; n=5) is shown in the histogram. (C) PPT/HeLa cells were incubated at 37 $^{\circ}$ C with 1.5 μ M (R/W)9-ASPNA-TAMRA in Opti-MEM medium for 4 h and cultured in DMEM for 24 h. Images were taken immediately (-IR) or after 2 min of irradiation (+IR). Light field (left panels) and fluorescent images (middle and right panels) are shown. Images were taken with a 10x objective (top panels) and a 40x objective (lower panels). Scale bar: 200 μ m (top panels), 50 μ m (lower panels).

Figure 5: Endocytosis pathways involved in (R/W)9-ASPNA-TR cell uptake.

PPT/HeLa cells were incubated with Opti-MEM medium containing 1.5 μ M (R/W)9-ASPNA-TR and (A) 25 μ g/ml Alexa Fluor 488-transferrin, (B) 0.15 μ M Alexa Fluor 488-dextran, or (C) 10 μ g/ml Alexa Fluor 488-Cholera Toxin subunit B at 37 $^{\circ}$ C for 2 h and then analyzed. (D) Cells were incubated with 1.5 μ M (R/W)9-ASPNA-TR conjugate and 1 μ M Alexa Fluor 488-LysoTracker for 4 h and grown for 22 h in conjugate-free medium. Cells were observed using a Zeiss Axio Observer.Z1 microscope. Left panels show differential interference contrast images, middle panels fluorescence images, and right panels overlays of the fluorescent images (i.e., merged green and red channels). Scale bar: 20 μ m.

Figure 6: Substitution of (R/W)9 arginines by lysines reduces cell uptake and antisense activity of the conjugated ASPNA.

(A) PPT/HeLa cells were incubated with 1 μ M (R/W)9-ASPNA-TR or 1 μ M (K/W)9-ASPNA-TR conjugates for 4 h. Intracellular fluorescence was measured by FACS, and the background fluorescence of the cells incubated with ASPNA-TR was subtracted. Histograms show the quantitative determinations (means \pm SD; n=6). (B) PPT/HeLa cells were incubated

with the indicated concentrations of (R/W)9-ASPNA-TR or (K/W)9-ASPNA-TR in serum-free Opti-MEM medium and 150 μ M chloroquine for 4 h. Luciferase expression was induced by addition of 150 μ L doxycycline. After 24 h cells were lysed and luciferase activity was measured. Values (means \pm SD of at least seven independent experiments) were normalized to the average value of the not PNA-treated sample.

Figure 7: Interaction of the conjugates with cell surface glycosaminoglycans.

(A) PPT/HeLa cells were pre-treated with 5 μ g/mL heparin for 30 min. The medium was then replaced with Opti-MEM medium containing 1 μ M (R/W)9-ASPNA-TR or 1 μ M (K/W)9-ASPNA-TR and 5 μ g/mL heparin. After 1 h at 37 $^{\circ}$ C, cells were washed and the fluorescence was measured by FACS. Values represent the means \pm SD of at least six independent experiments. (B) CHO K1 and CHO 745 cells were treated with 1 μ M of the indicated conjugates for 4 h. The fluorescence was quantified by FACS. The values are the means \pm SD of at least three independent experiments.

Supplementary Figure 1: Relative luciferase activity in PPT/HeLa cells incubated with 1 μ M of the indicated (R/W)9-ASPNA conjugates in serum-free Opti-MEM medium in the presence or absence (NT) of 150 μ M chloroquine for 4 h. Luciferase activity was measured 24 h later and is expressed as luminescence/mg of protein. Percentages refer to untreated cells. The values represent the mean \pm SD of three independent experiments.

Supplementary Figure 2: Relative luciferase activity in PPT/HeLa cells incubated with (R/W)9-ASPNA or (R/W)9-ASPNA-TAMRA at the indicated concentrations in serum-free Opti-MEM medium in the presence of 5 μ M AlPcS_{2a} for 4h. Cells were irradiated with red light (9 min) before doxycycline induction and luciferase activity was measured 24 h later.

Supplementary Figure 3: Uptake of (R/W)9-ASPNA and (K/W)9-ASPNA into different human cell lines. U2OS (dark grey bars), MCF-7 (white bars), DU-145 (black bars), and Jurkat cells (light grey bars) were incubated with 1 μ M (R/W)9-ASPNA or 1 μ M (K/W)9-ASPNA for 4 h and the fluorescence was quantified by FACS. Values represent the means \pm SD of at least three independent experiments.

Supplementary Figure 4: Inhibition of luciferase translation initiation in permeabilized PPT/HeLa cells. PPT/HeLa cells permeabilized with streptolysin-*O* were transfected with 1 μ M naked ASPNA or ASPNA conjugated to (R/W)9 or (K/W)9. Luciferase activity was measured 24 h later and is expressed as luminescence/mg of protein. Percentages refer to untreated cells. Values represent the means \pm SD of at least three independent experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Loll François for microscopy experiments. C. C. was supported by the French Ministry for Research. This work was supported by CNRS, INSERM, and MNHN.

REFERENCES

1. Lundin, K. E., Good, L., Strömberg, R., Gräslund, A. and Smith, C. I. E. (2006) Biological activity and biotechnological aspects of peptide nucleic acid. *Adv. Genet.*, **56**, 1–51.
2. Nielsen, P. E. (2010) Peptide nucleic acids (PNA) in chemical biology and drug discovery. *Chem. Biodivers.*, **7**, 786–804.
3. Dean, D. A. (2000) Peptide nucleic acids: versatile tools for gene therapy strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **44**, 81–95.
4. Lebleu, B., Moulton, H. M., Abes, R., Ivanova, G. D., Abes, S., Stein, D. A., Iversen, P. L., Arzumanov, A. A. and Gait, M. J. (2008) Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 517–529.
5. Nielsen, P. E. and Shiraishi, T. (2011) Peptide nucleic acid (PNA) cell penetrating peptide (CPP) conjugates as carriers for cellular delivery of antisense oligomers. *Artif DNA PNA XNA*, **2**, 90–99.
6. Marlin ,F., Simon, P., Saison-Behmoaras, T. and Giovannangeli, C. (2010) Delivery of oligonucleotides and analogues: the oligonucleotide conjugate-based approach. *Chembiochem*, **11**, 1493–1500.
7. Wadia, J.S ., Stan, R. V. and Dowdy, S. F. (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.*, **10**, 310–315.
8. Kang, S. H., Cho, M. J. and Kole, R. (1998) Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry*, **37**, 6235–6239.
9. Bendifallah, N., Rasmussen, F. W., Zachar, V., Ebbesen, P., Nielsen, P. E. and Koppelhus, U. (2006) Evaluation of cell-penetrating peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid (PNA). *Bioconjug. Chem.*, **17**, 750–758.
10. Saleh, A. F., Arzumanov, A., Abes, R., Owen, D., Lebleu, B. and Gait, M. J. (2010) Synthesis and splice-redirecting activity of branched, arginine-rich peptide dendrimer conjugates of peptide nucleic acid oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.*, **21**, 1902–1911.
11. Abes, S., Turner, J. J., Ivanova, G. D., Owen, D., Williams, D., Arzumanov, A., Clair, P., Gait, M. J. and Lebleu, B. (2007) Efficient splicing correction by PNA conjugation to an R6-Penetratin delivery peptide. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 4495–4502.
12. Wu, R. P., Youngblood, D. S., Hassinger, J. N., Lovejoy, C. E., Nelson, M. H., Iversen, P. L. and Moulton, H. M. (2007) Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5182–5191.
13. Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S. and Gräslund, A. (2011) Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys*, **2011**, 414729.

14. Boutimah-Hamoudi, F., Leforestier, E., Sénamaud-Beaufort, C., Nielsen, P. E., Giovannangeli, C. and Saison-Behmoaras, T. E. (2007) Cellular antisense activity of peptide nucleic acid (PNAs) targeted to HIV-1 polypurine tract (PPT) containing RNA. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3907–3917.
15. Delaroche, D., Aussedat, B., Aubry, S., Chassaing, G., Burlina, F., Clodic, G., Bolbach, G., Lavielle, S. and Sagan, S. (2007) Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag. *Anal. Chem.*, **79**, 1932–1938.
16. Aubry, S., Aussedat, B., Delaroche, D., Jiao, C.-Y., Bolbach, G., Lavielle, S., Chassaing, G., Sagan, S. and Burlina, F. (2010) MALDI-TOF mass spectrometry: a powerful tool to study the internalization of cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, **1798**, 2182–2189.
17. Erbacher, P., Roche, A. C., Monsigny, M. and Midoux, P. (1996) Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp. Cell Res.*, **225**, 186–194.
18. Berg, K., Selbo, P. K., Prasmickaite, L., Tjelle, T. E., Sandvig, K., Moan, J., Gaudernack, G., Fodstad, O., Kjølrsrud, S., Anholt, H., et al. (1999) Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res.*, **59**, 1180–1183.
19. Shiraishi, T. and Nielsen, P. E. (2006) Photochemically enhanced cellular delivery of cell penetrating peptide-PNA conjugates. *FEBS Lett.*, **580**, 1451–1456.
20. Bøe, S. L., Longva, A. S. and Hovig, E. (2011) A novel photosensitizer for light-controlled gene silencing. *Nucleic Acid Ther.*, **21**, 359–367.
21. Srinivasan, D., Muthukrishnan, N., Johnson, G. A., Erazo-Oliveras, A., Lim, J., Simanek, E.E. and Pellois, J.-P. (2011) Conjugation to the cell-penetrating peptide TAT potentiates the photodynamic effect of carboxytetramethylrhodamine. *PLoS ONE*, **6**, e17732.
22. Aubry, S., Burlina, F., Dupont, E., Delaroche, D., Joliot, A., Lavielle, S., Chassaing, G. and Sagan, S. (2009) Cell-surface thiols affect cell entry of disulfide-conjugated peptides. *FASEB J.*, **23**, 2956–2967.
23. Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A. T. and Futaki, S. (2008) Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug. Chem.*, **19**, 656–664.
24. Burlina, F., Sagan, S., Bolbach, G. and Chassaing, G. (2005) Quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides by MALDI-TOF mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 4244–4247.
25. Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. and Lebleu, B. (2003) Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.*, **278**, 585–590.
26. Vercauteren, D., Vandenbroucke, R. E., Jones, A. T., Rejman, J., Demeester, J., De Smedt, S. C., Sanders, N. N. and Braeckmans, K. (2010) The use of inhibitors to study

- endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol. Ther.*, **18**, 561–569.
27. Mousavi, S. A., Malerød, L., Berg, T. and Kjekken, R. (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.*, **377**, 1–16.
 28. Liu, A. P., Aguet, F., Danuser, G. and Schmid, S. L. (2010) Local clustering of transferrin receptors promotes clathrin-coated pit initiation. *J. Cell Biol.*, **191**, 1381–1393.
 29. Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H. and Harashima, H. (2006) Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.*, **58**, 32–45.
 30. Franco, C. R., Rocha, H. A., Trindade, E. S., Santos, I. A., Leite, E. L., Veiga, S. S., Nader, H. B. and Dietrich, C. P. (2001) Heparan sulfate and control of cell division: adhesion and proliferation of mutant CHO-745 cells lacking xylosyl transferase. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **34**, 971–975.
 31. Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F. and Wrana, J. L. (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.*, **5**, 410–421.
 32. El-Andaloussi, S., Johansson, H. J., Lundberg, P. and Langel, U. (2006) Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *J Gene Med*, **8**, 1262–1273.
 33. Koppelhus, U., Awasthi, S. K., Zachar, V., Holst, H. U., Ebbesen, P. and Nielsen, P. E. (2002) Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **12**, 51–63.
 34. Drin, G., Cottin, S., Blanc, E., Rees, A. R. and Temsamani, J. (2003) Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.*, **278**, 31192–31201.
 35. Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J. C., et al. (2004) Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.*, **10**, 1011–1022.
 36. Ivanova, G. D., Arzumanov, A., Abes, R., Yin, H., Wood, M. J. A., Lebleu, B. and Gait, M. J. (2008) Improved cell-penetrating peptide-PNA conjugates for splicing redirection in HeLa cells and exon skipping in mdx mouse muscle. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 6418–6428.
 37. Amand, H. L., Rydberg, H. A., Fornander, L. H., Lincoln, P., Nordén, B. and Esbjörner, E. K. (2012) Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 2669–2678.
 38. Amand, H. L., Boström, C. L., Lincoln, P., Nordén, B. and Esbjörner, E. K. (2011) Binding of cell-penetrating penetratin peptides to plasma membrane vesicles correlates directly with cellular uptake. *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 1860–1867.
 39. Bechara, C., Pallerla, M., Zaltsman, Y., Burlina, F., Alves, I. D., Lequin, O. and Sagan, S. (2013) Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB J.*, **27**, 738–749.

Table 1

ASPNA: H-TCCCCCCTTTTCT-Lys

SCRPNNA: H-TTTCCTCTCCCT-Lys

(R/W)₉: RRWWRRWRR-NH₂

(K/W)₉: KKWWKKWKK-NH₂

H-Cys-PNA- (Lys,TR or TAMRA)

§
§ (mal)

H-Cys- (R/W)₉ or (K/W)₉

Fig. 1

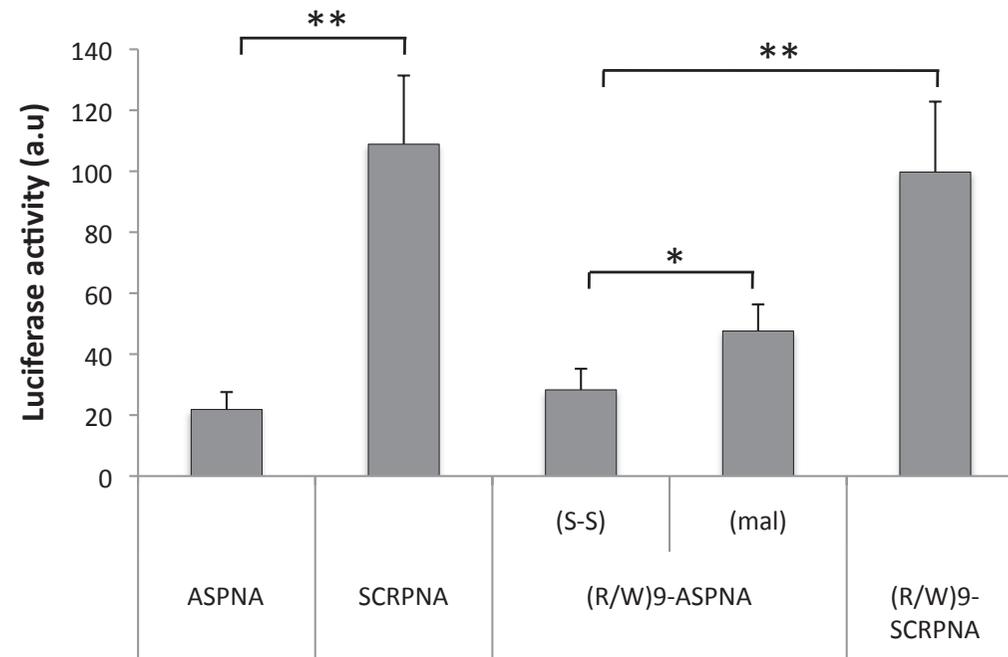
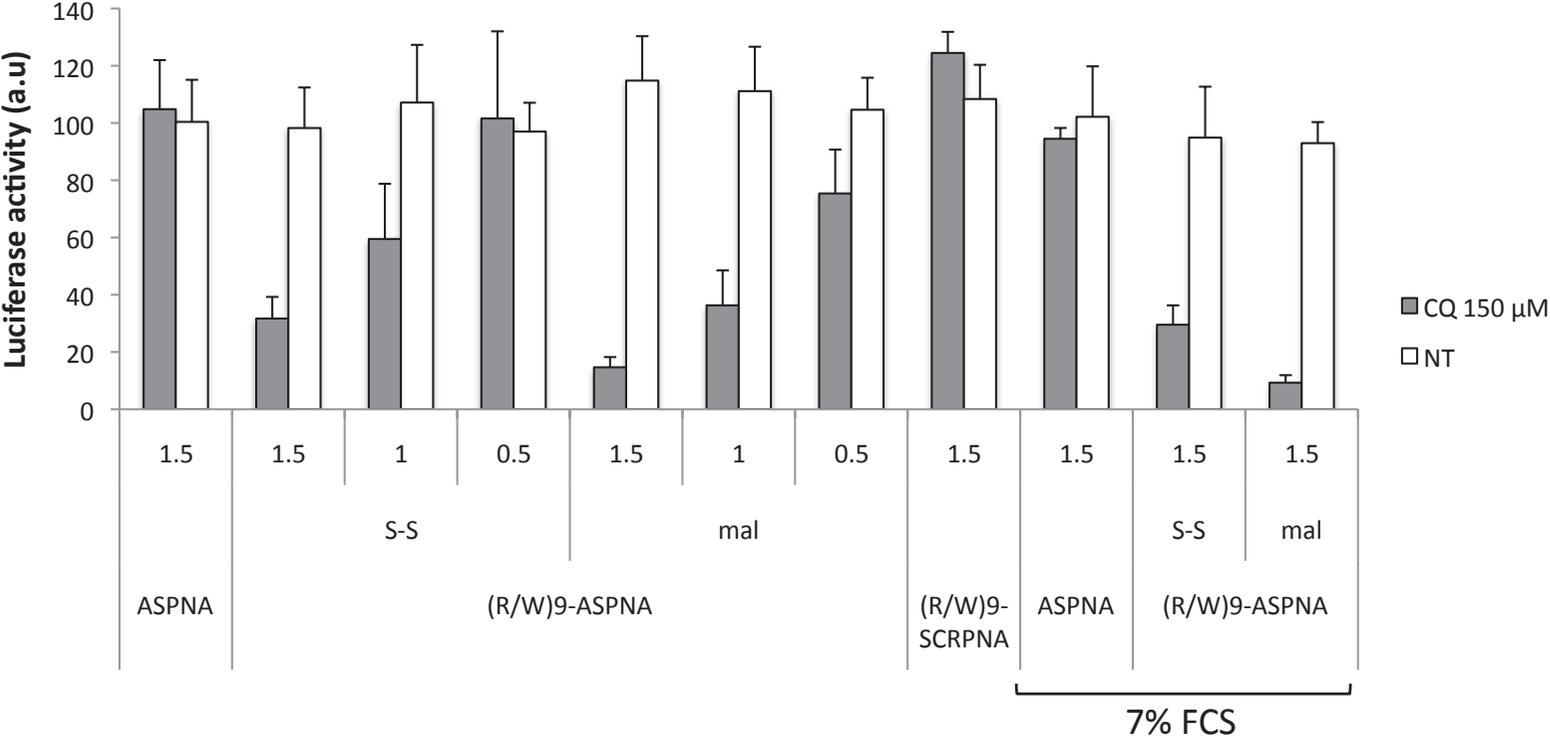


Fig. 2

A



B

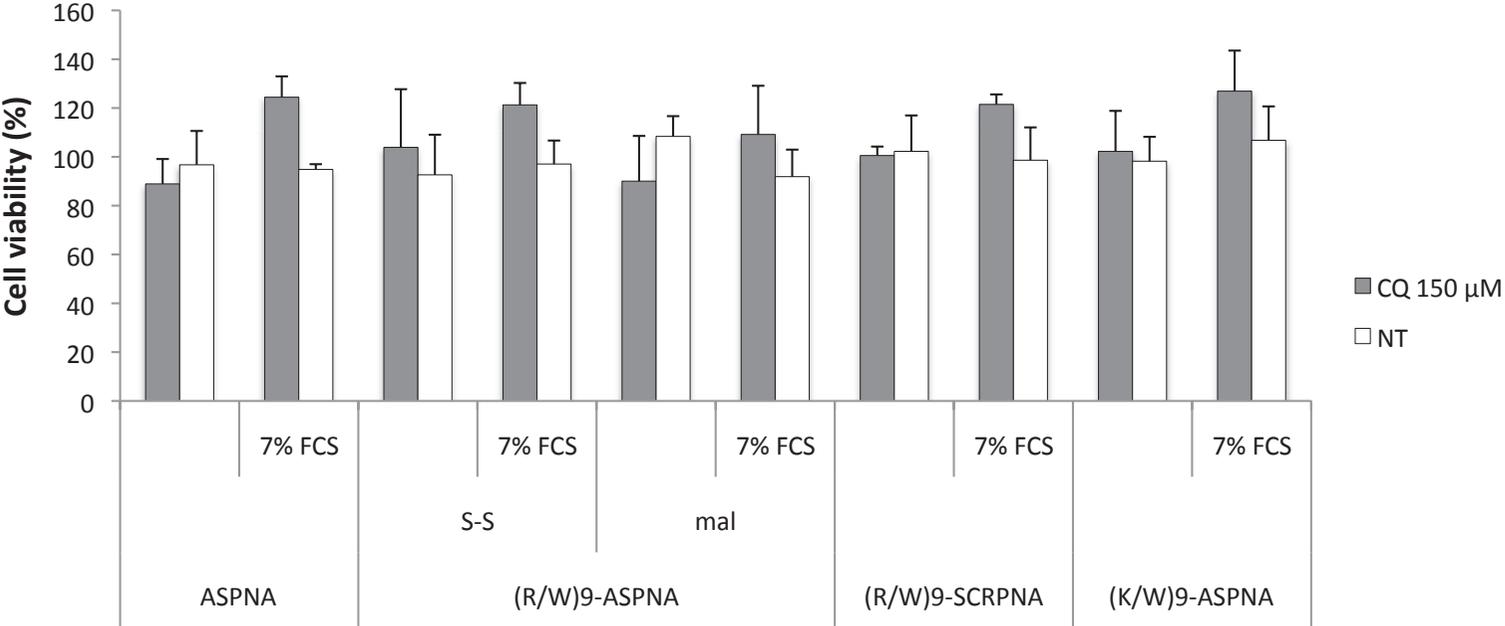


Fig. 3

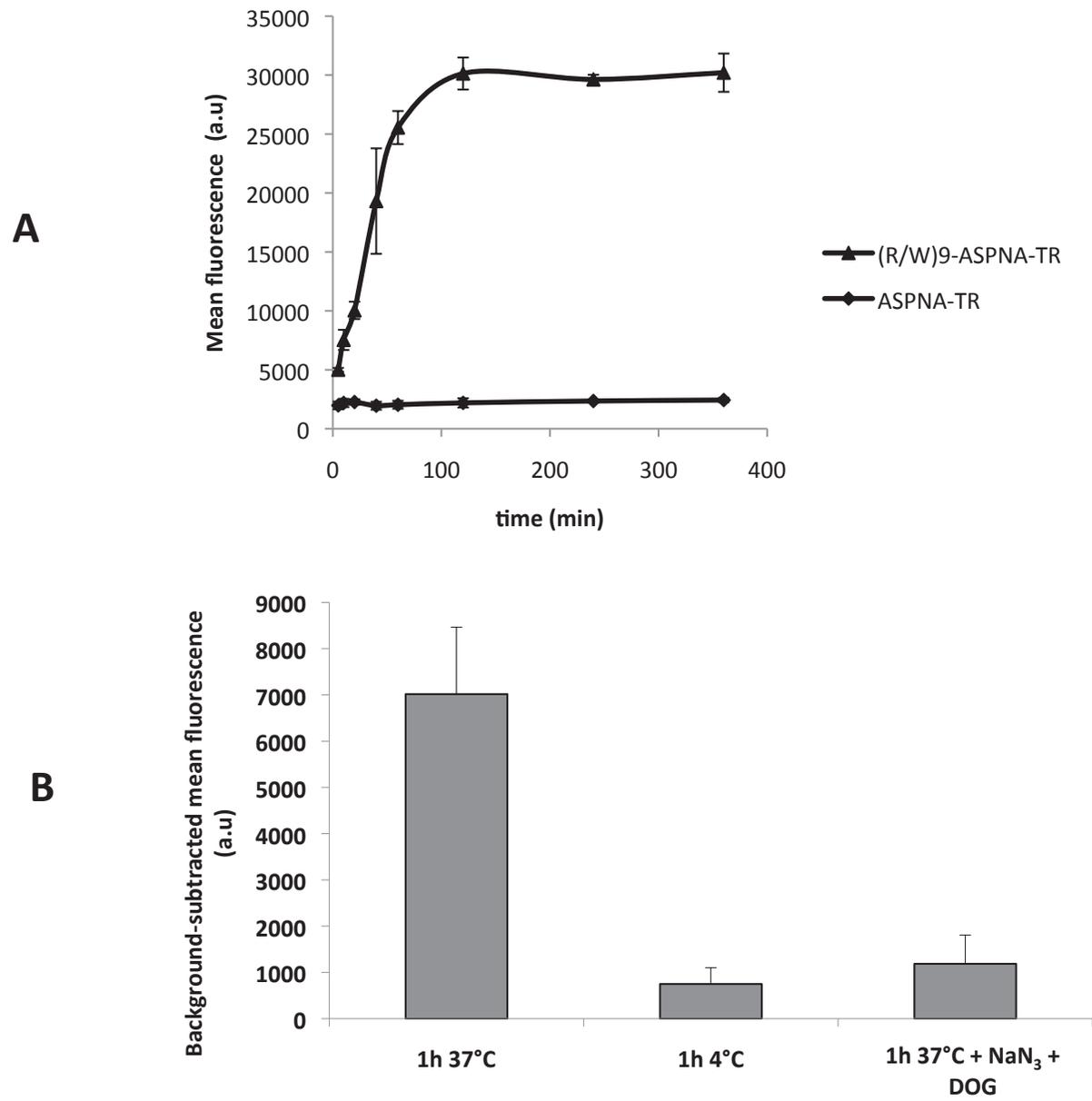
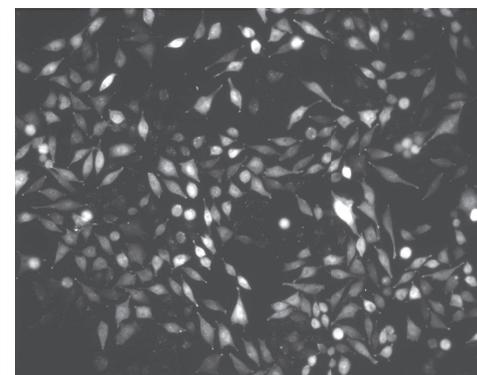
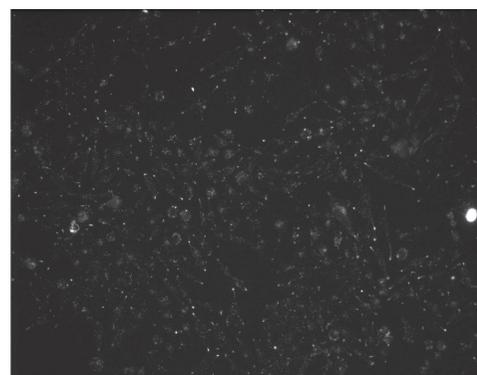
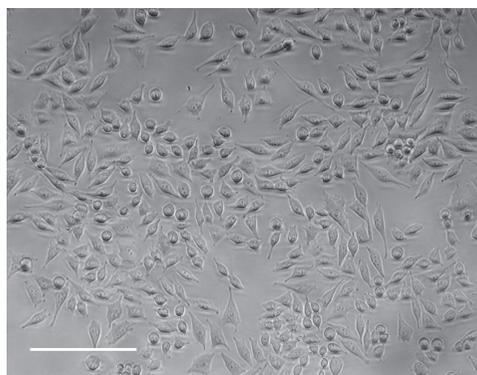


Fig. 4

(R/W)9-ASPNA-TAMRA

- IR

+ IR



C

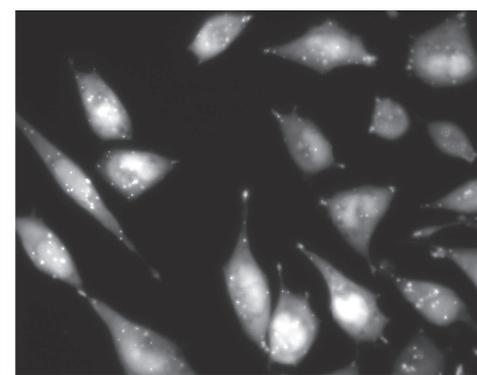
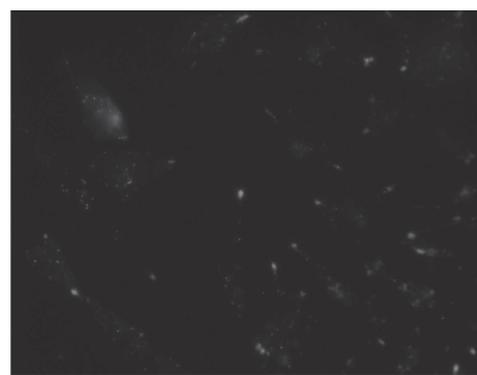
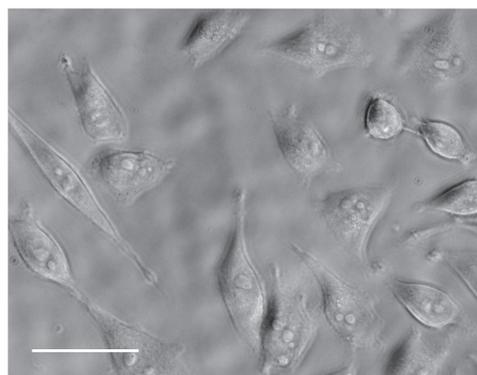


Fig. 5

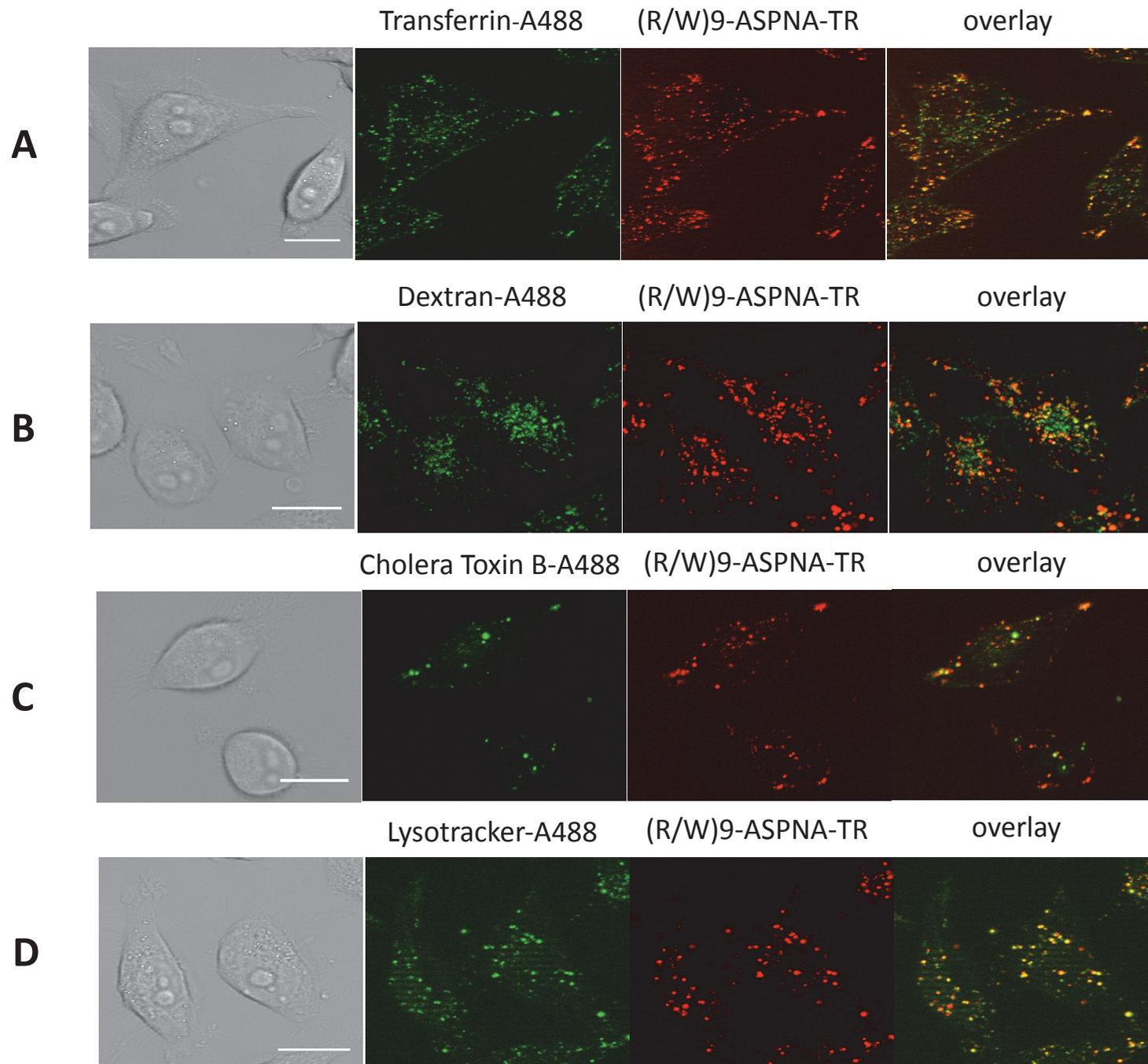
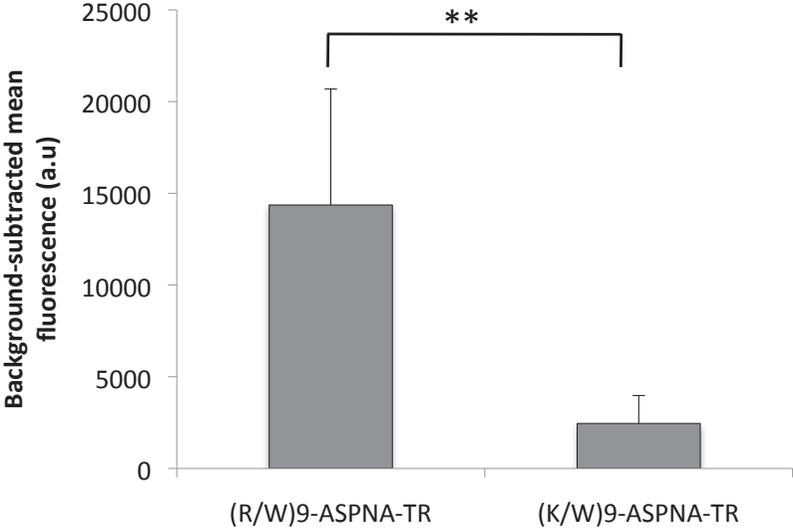


Fig. 6

A



B

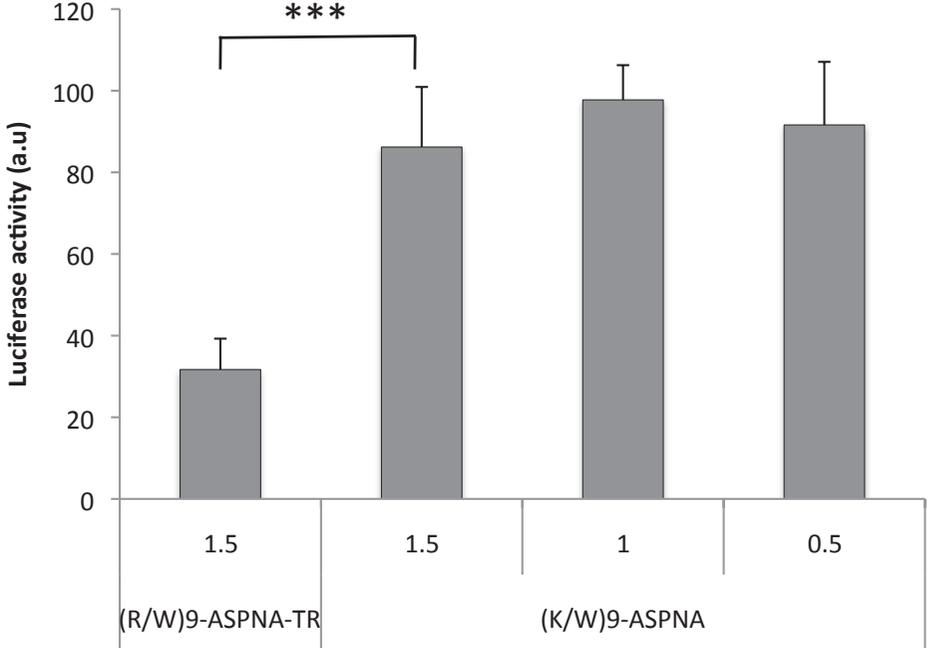
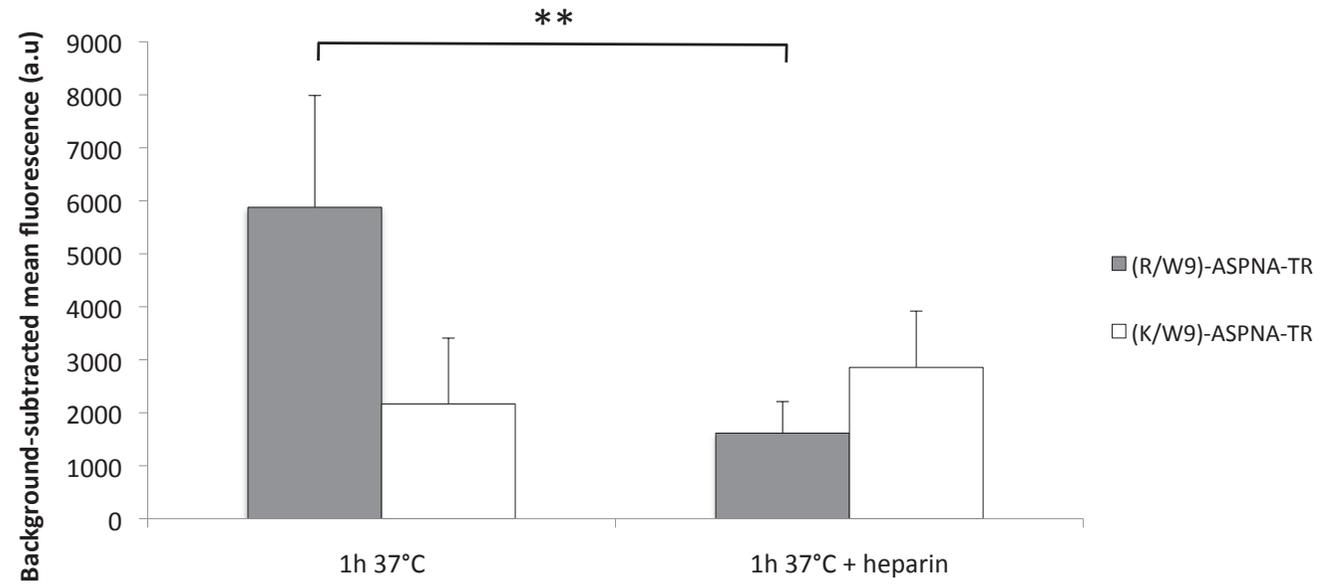
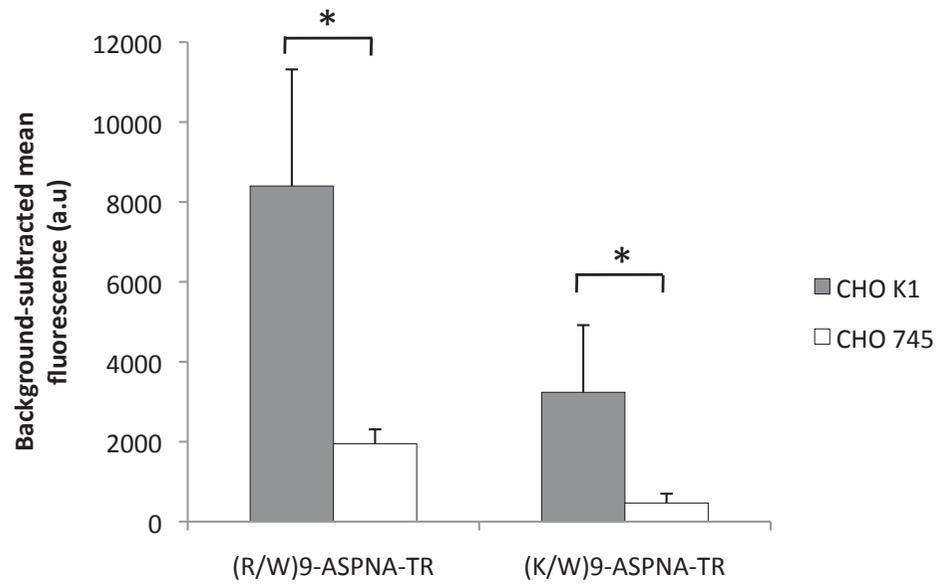


Fig. 7

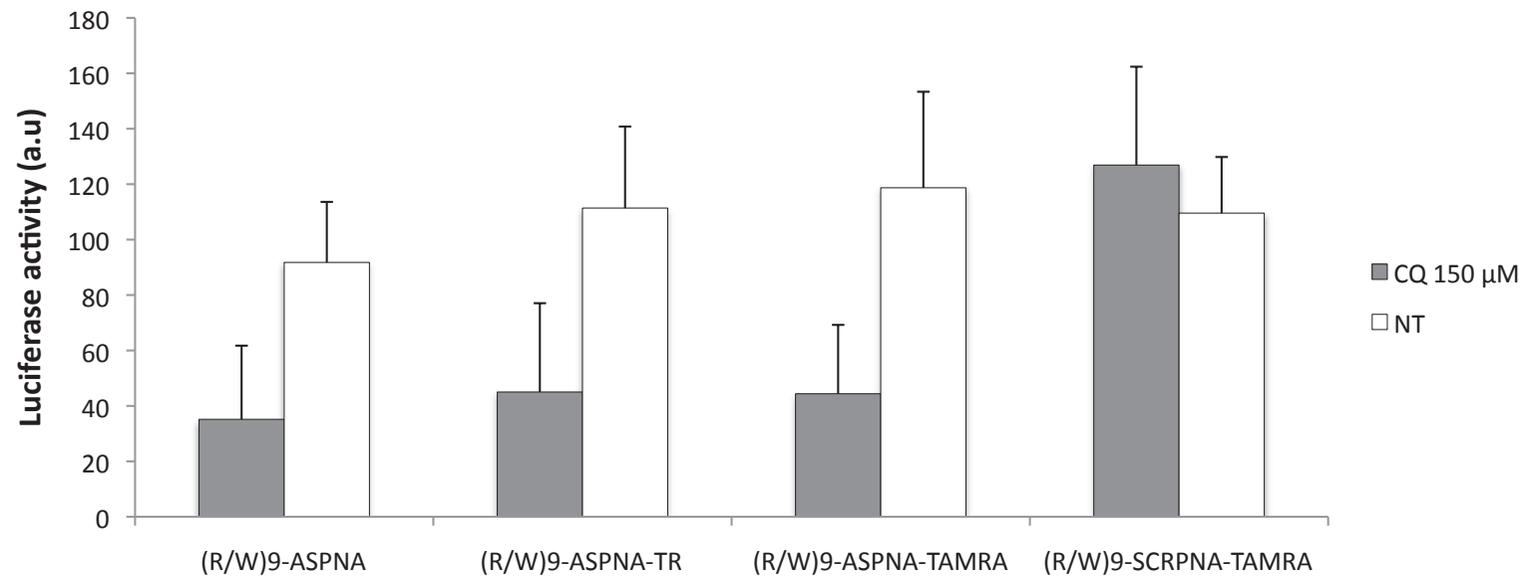
A



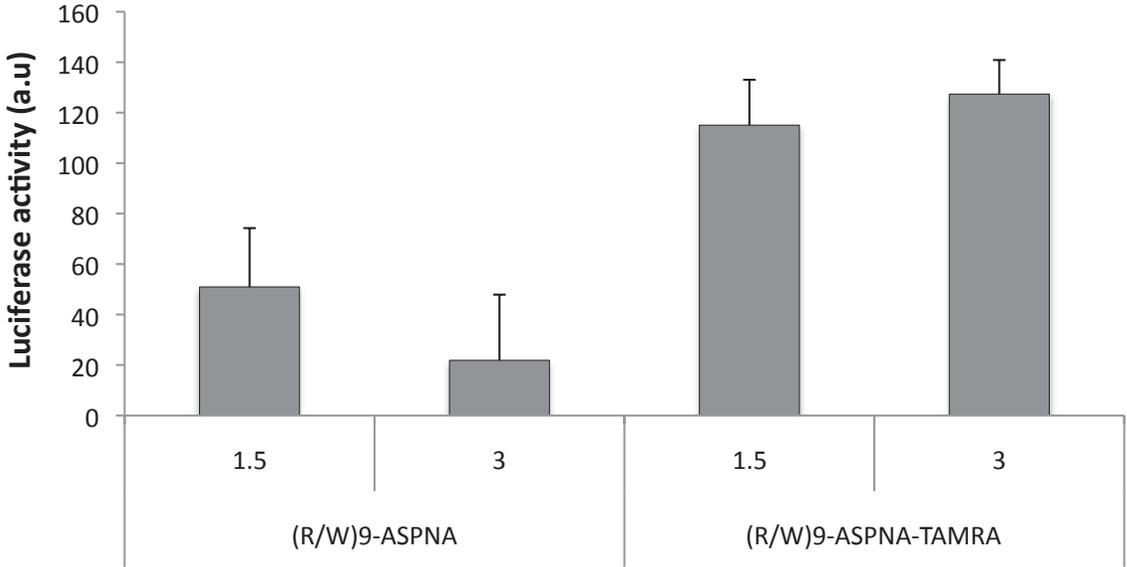
B



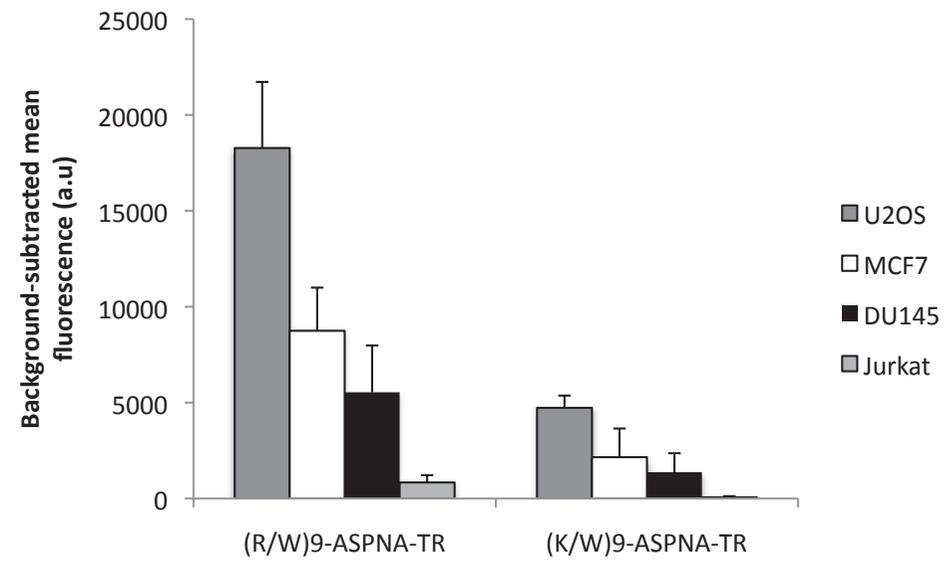
Supplementary Fig. 1



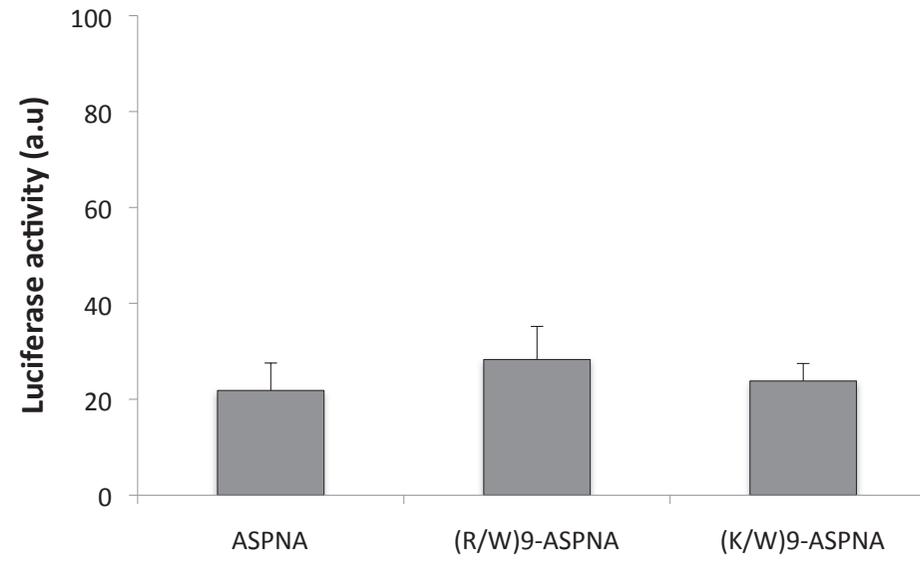
Supplementary Fig.2



Supplementary Fig.3



Supplementary Fig.4



c) Internalisation Photochimique (PCI) : études complémentaires

La Figure 52 met en évidence la relocalisation du conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA des endosomes vers le cytoplasme puis vers le noyau, sous l'effet de l'irradiation en continu sous le microscope LEICA DMIRE2 avec le filtre rhodamine. Le conjugué semble s'accumuler majoritairement dans le noyau au bout de minutes, bien qu'un marquage cytoplasmique diffus persiste. Comme on peut le voir sur la dernière image (t3), un signal de fluorescence associé à des endosomes est encore observé après l'irradiation, ce qui signifie que tous les endosomes ne libèrent pas leur contenu au cours de la PCI.

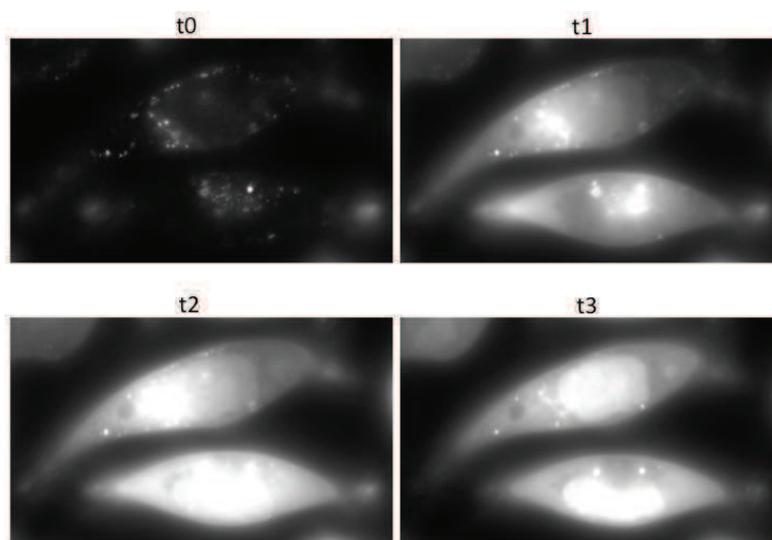


Figure 52 : PCI du conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA dans les cellules HeLa 1002.

Le conjugué est incubé pendant 4h à 1,5 μM dans de l'opti-MEM, puis les cellules sont cultivées pendant 24h dans du milieu DMEM + 7% SVF, avant d'observer la fluorescence associée à la TAMRA avec le microscope Leica DMIRE2. Les images représentent la fluorescence de la TAMRA observée à l'objectif 63X et à différents temps d'irradiation. t0 = 0s, t1 = 10s, t2 = 15s, t3 = 60s

Nous avons ensuite voulu savoir si cette relocalisation par PCI permet de libérer une quantité suffisante de PNA ou de conjugué dans le noyau pour obtenir une inhibition de l'activité luciférase. Pour cela, les valeurs de luciférase obtenues après PCI dans les cellules traitées avec le conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA seront comparées à celles des cellules traitées avec un conjugué contrôle (R/W)9-scr2-TAMRA, composé du même CPP (R/W)9 et d'un PNA *scramble*. Pour s'assurer que la PCI est aussi observée avec ce conjugué contrôle, les cellules HeLa 1002 ont été traitées dans les mêmes conditions que pour le conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA, soit 4h à 1,5 μM ou 3 μM , avec une observation au microscope 24h plus tard. La Figure 53 représente les images obtenues et montre que le phénomène de PCI est bien

reproduit avec le conjugué contrôle, dès 1,5 μM au bout de 2 min, avec une accumulation nucléaire qui est encore plus prononcée à 3 μM en conjugué.

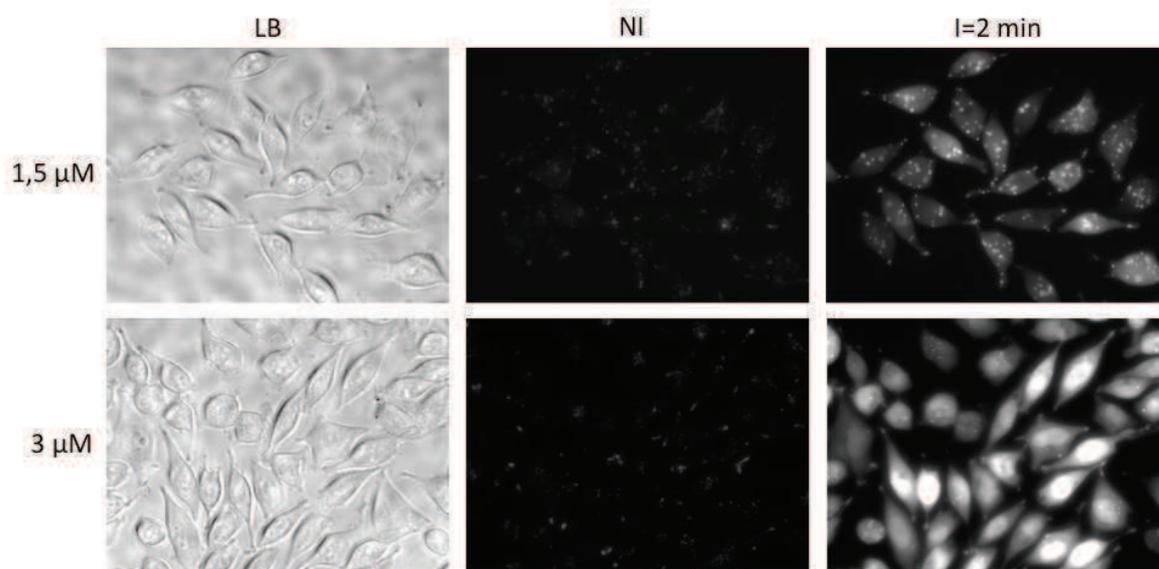


Figure 53 : PCI observée pour le conjugué (R/W)9-scr2-TAMRA dans les cellules HeLa 1002.

Les cellules sont traitées pendant 4h avec le conjugué à 1,5 (images du haut) ou 3 μM , puis cultivées pendant 24h dans du DMEM + 7% SVF, avant d'observer la fluorescence associée à la TAMRA, avec le microscope Leica DMIRE2 et l'objectif 40X. LB : lumière blanche, NI : non irradiées, I =2 min : après 2 min d'irradiation

L'activité luciférase après traitement des cellules HeLa 1002 pendant 4h avec le conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA ou le conjugué (R/W)9-scr2-TAMRA, irradiation à 545 nm et mesure de l'activité luciférase 24h après induction de son expression a ensuite été déterminée. Différentes puissances et durées d'irradiation ont été testées (11 mW/cm^2 pendant 10 min ; 120 mW/cm^2 pendant 5/10/15/30 min ; 135 mW/cm^2 pendant 15 et 30 min ; 270 mW/cm^2 pendant 15 min) et étaient associées à une photo-libération dans le cytoplasme, systématiquement vérifiée au microscope après l'irradiation des cellules. Aucune inhibition de la luciférase n'a été obtenue dans ces conditions. La Figure 54 présente les résultats obtenus pour une irradiation à 270 mW/cm^2 pendant 15 min. Aucune inhibition n'est observée en absence d'irradiation des cellules et, de manière inattendue, nous observons des exaltations pour les cellules irradiées. Ces exaltations sont plus importantes pour le conjugué contrôle que pour le conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA.

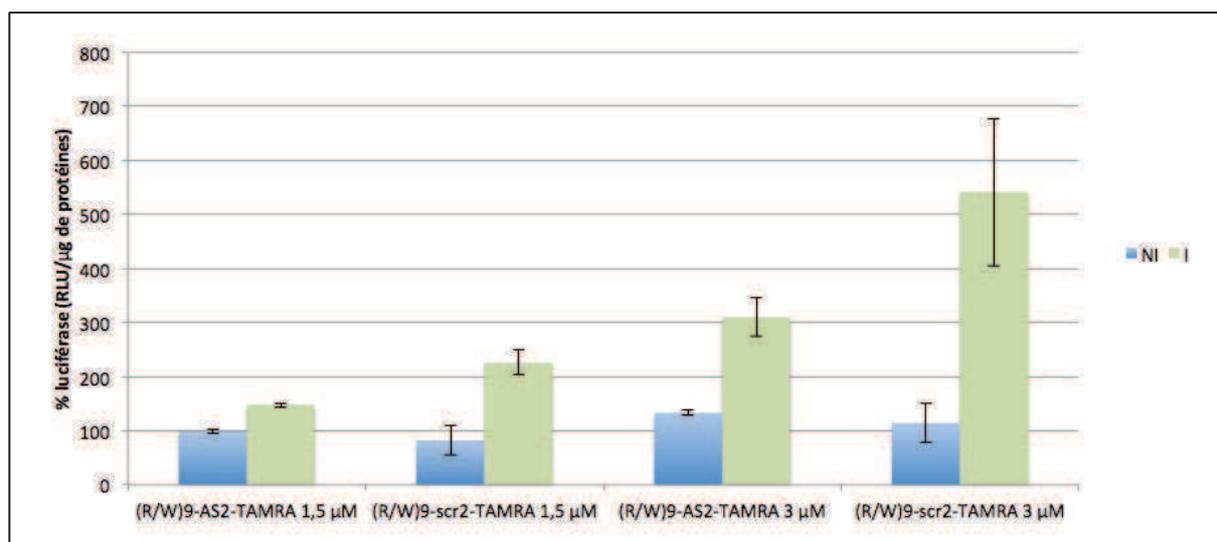


Figure 54 : Activité luciférase obtenue pour les conjugués (R/W)9-PNA-TAMRA après PCI.

Les cellules HeLa 1002 ont été traitées pendant 4h à 37°C avec les conjugués aux concentrations indiquées, et irradiées 24h plus tard pendant 15 min à 270 mW/cm² à 545 nm. L'activité luciférase a été mesurée 24 heures après ajout de la doxycycline, successivement à l'irradiation.

Le Tableau 6 récapitule les résultats obtenus au cours des expériences de PCI, en présence ou non de phthalocyanine d'aluminium.

Conditions d'irradiation	Puissance (mW/cm ²)	Photosensibilisateur	(R/W)9-AS2	(R/W)9-AS2-TAMRA
9 min à 650 nm	250	phthalocyanine d'aluminium	+	-
15 min à 545 nm	270	TAMRA		-

Tableau 6 : Conditions de PCI réalisées dans nos études avec les conjugués (R/W)9-AS2 et (R/W)9-AS2-TAMRA.

En absence de phthalocyanine d'aluminium, la PCI est assurée par la TAMRA située sur le conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA. Les + ou - signifient qu'une activité biologique a été observée (+) ou non (-) dans ces conditions.

1. 3. Conjugués CPP-AS1

Les études mécanistiques sur l'internalisation du PNA AS2 par le CPP (R/W)9 ont également été réalisées avec le PNA AS1.

Les valeurs d'activité luciférase obtenues dans les cellules HeLa 1002 perméabilisées avec la SLO, avec les conjugués CPP-AS1, en comparaison aux résultats qui ont été obtenus

pour les conjugués CPP-AS2 (déjà présentés dans l'article décrit plus haut), sont présentées sur la Figure 55. Ces valeurs sont exprimées en % d'activité luciférase par rapport à celles des cellules perméabilisées en absence de PNA ou de conjugué (fixées à 100%). En accord avec ce qui a été montré par Boutimah et al, le PNA AS1 nu inhibe l'activité luciférase d'environ 60%, et cette inhibition est inférieure à celle obtenue avec le PNA AS2 (Boutimah-Hamoudi et al. 2007). Comme nous l'avons montré dans le cas du PNA AS1, le couplage des CPP (K/W)9 et (R/W)9 par pont disulfure au PNA AS1, n'affecte pas l'activité de ce dernier. L'activité du conjugué maléimide (R/W)9-AS1(mal) semble être là aussi inférieure à celle du conjugué disulfidique (R/W)9-AS1. Cependant, l'expérience devra être renouvelée pour déterminer si cette légère différence est réellement significative. Le contrôle de la spécificité des inhibitions obtenues pour ces conjugués CPP-AS1 est réalisé par comparaison avec le conjugué (R/W)9-scr1, le scr1 étant un PNA *scramble* de même composition en bases que le PNA AS1.

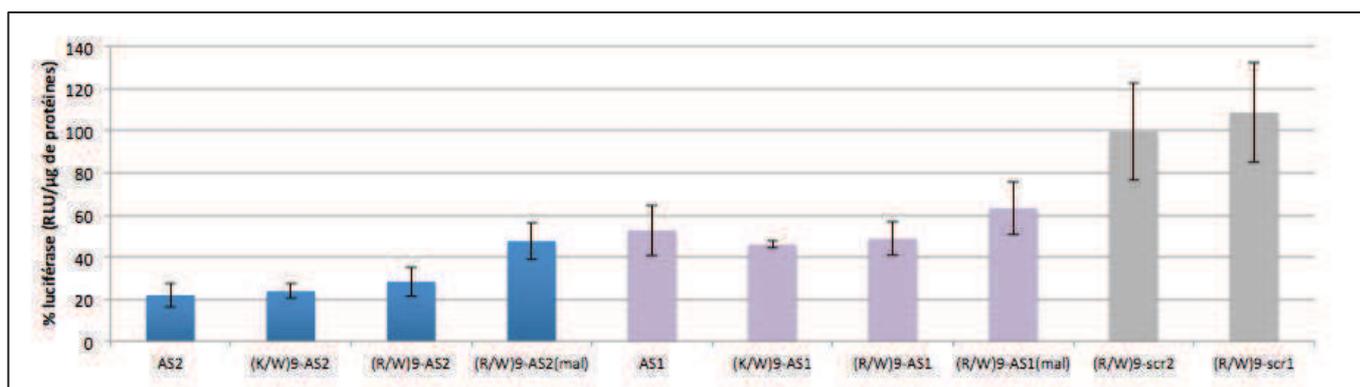


Figure 55 : Inhibition de l'activité luciférase par les PNA et conjugués PNA-CPP dans les cellules HeLa 1002 perméabilisées avec la SLO.

Les cellules HeLa sont perméabilisées pendant 15 min en présence de SLO et du PNA ou conjugué indiqué à 1 μM final. L'activité luciférase est mesurée 24h après induction de l'expression du gène par la doxycycline et exprimée en % par rapport aux valeurs obtenues pour les cellules perméabilisées non traitées.

La quantification par cytométrie en flux de l'internalisation du conjugué (R/W)9-AS1 conjugué au TR en 4h dans les cellules HeLa 1002 montre que ce conjugué est environ deux fois moins internalisé que le conjugué (R/W)9-AS2-TR (Figure 56). Ce résultat suggère un effet de la séquence du PNA sur l'efficacité de son internalisation par CPP. La variabilité des données est assez grande, c'est pourquoi cette expérience serait à reproduire. Cependant l'analyse statistique indique que cette différence est significative. Les résultats présentés sur la Figure 57 ont confirmé cette différence d'internalisation entre les deux conjugués, dans

quatre autres lignées cellulaires humaines. La séquence même du PNA peut donc moduler l'efficacité de son internalisation, probablement en influant sur les structures intramoléculaires du PNA, ou sur les interactions PNA-PNA et l'état d'aggrégation des conjugués.

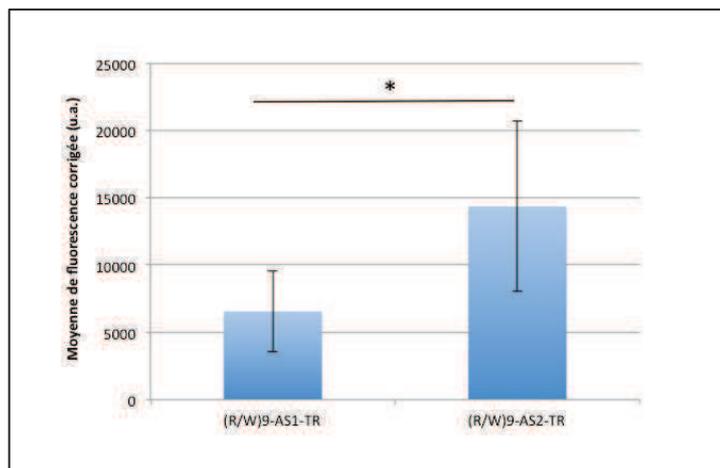


Figure 56 : Internalisation des PNA AS1 et AS2 conjugués au CPP (R/W)9 dans les cellules HeLa 1002.
 Les cellules HeLa 1002 ont été traitées pendant 4h à 37°C avec le conjugué indiqué à 1 µM. La fluorescence du Texas Red (TR) est ensuite mesurée par cytométrie de flux. Les moyennes de fluorescence ont été corrigées par soustraction de la fluorescence obtenue par les PNA AS1 et AS2 non conjugués au CPP. *pvalue = 0,037 avec le test Mann Whitney.

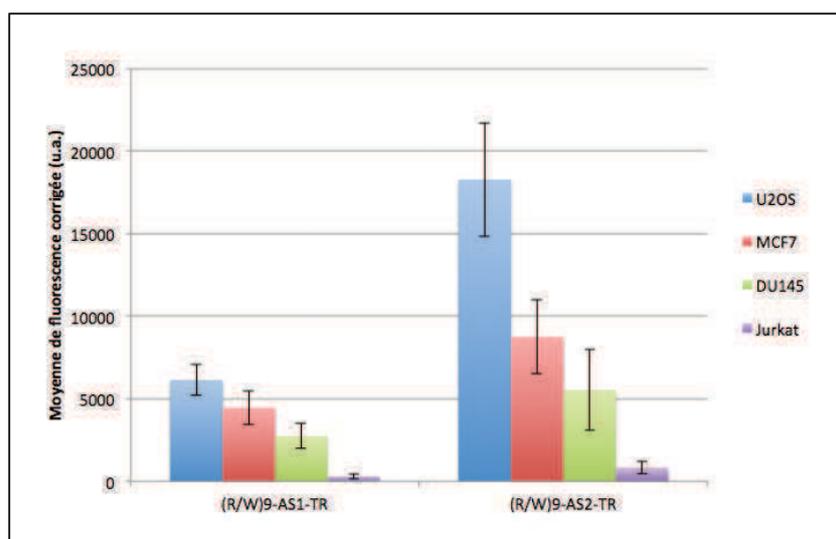


Figure 57 : Internalisation des PNA AS1 et AS2 conjugués au CPP (R/W)9 dans 4 lignées cellulaires humaines.

Les cellules ont été traitées pendant 4h à 37°C avec le conjugué indiqué à 1 µM. La fluorescence du Texas Red (TR) est ensuite mesurée par cytométrie de flux. Les moyennes de fluorescence ont été corrigées par soustraction de la fluorescence obtenue par les PNA AS1 et AS2 non conjugués au CPP.

L'investigation du mécanisme d'internalisation du conjugué (R/W)9-AS1-TR, par des expériences de déplétion énergétique, a révélé que l'endocytose est le processus majoritairement impliqué (Figure 58), comme c'est aussi le cas pour le conjugué (R/W)9-AS2-TR. En effet, l'internalisation est fortement diminuée lorsque le conjugué est incubé à 4°C ou à 37°C en présence d'inhibiteurs d'ATP, l'azoture de sodium (NaN₃) et le 2-déoxy-D-glucose (DOG). Le NaN₃ est un agent découplant des phosphorylations oxydatives de la chaîne respiratoire et le DOG est un inhibiteur compétitif de la glycolyse. Ces molécules inhibent la production d'ATP. A 4°C, les réactions dépendantes de l'énergie sont également inhibées, c'est pourquoi ces deux conditions (4°C et présence de NaN₃+DOG) sont classiquement utilisées pour mettre en évidence l'internalisation d'une molécule par endocytose. Les images de microscopie de fluorescence mettent en évidence un marquage beaucoup moins intense, et la quantification de la fluorescence associée au Texas Red par cytométrie de flux montre une diminution de celle-ci dans ces conditions de déplétion énergétique (Figure 58).

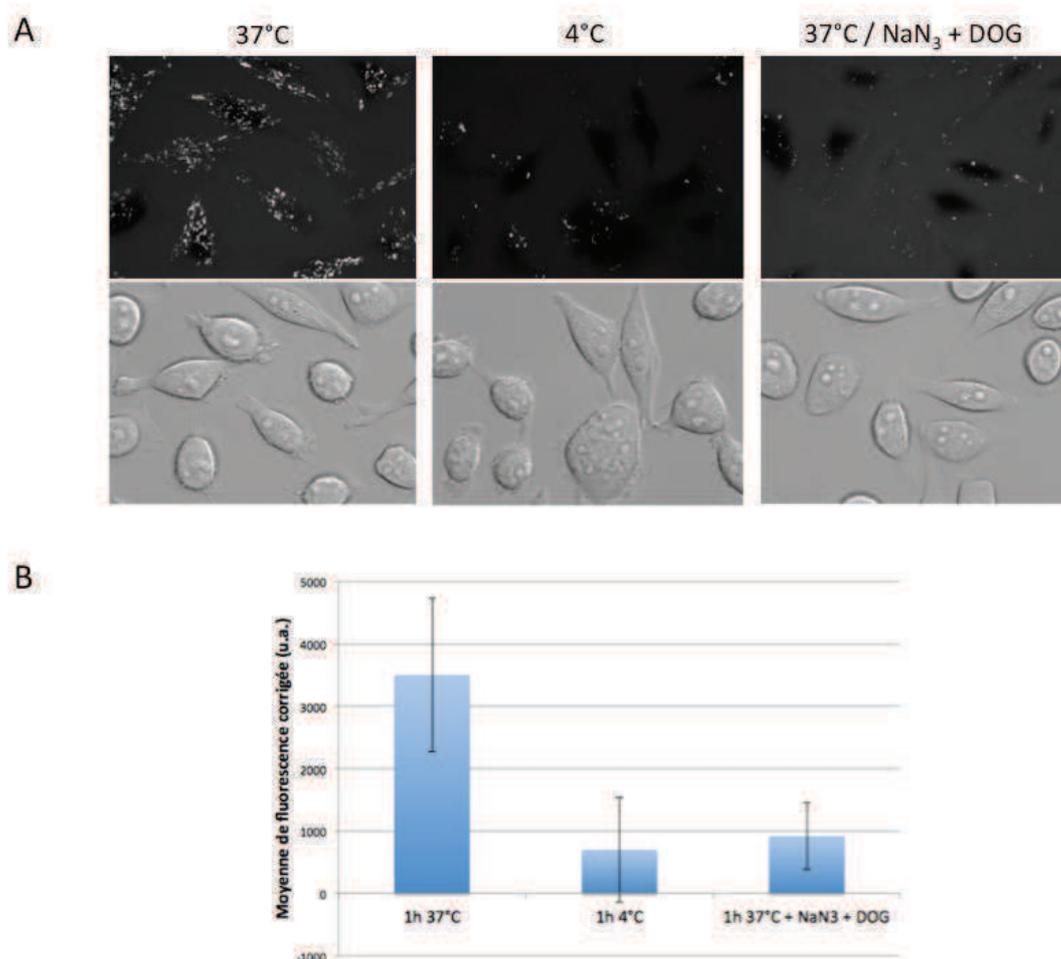


Figure 58 : Dépendance énergétique de l'internalisation du conjugué (R/W)9-AS1-TR dans les cellules HeLa 1002.

Les cellules HeLa 1002 sont incubées pendant 1h avec le conjugué (R/W)9-AS1-TR à 1 μ M, à 37°C, à 4°C ou à 37°C en présence de 10 mM d'azoture de sodium (NaN₃) et de 6 mM de 2-déoxy-D-glucose (DOG). Des acquisitions microscopiques sont ensuite réalisées avec le microscope Zeiss Axio Observer Z1 (A) et la fluorescence est quantifiée par cytométrie en flux (B). A : les images du haut correspondent au signal du Texas Red et celles du bas correspondent aux images en lumière blanche. B : Les moyennes de fluorescence ont été corrigées par soustraction de la valeur correspondant à l'autofluorescence des cellules (cellules non traitées).

Nous avons mis en évidence dans l'article présenté plus haut, une interaction entre le conjugué (R/W)9-AS2-TR et les glycosaminoglycanes (GAG) membranaires tels que les héparanes sulfates (HS) et les chondroïtines sulfates (CS), probablement à l'origine de son internalisation. Pour rechercher si le conjugué (R/W)9-AS1-TR interagit avec ces mêmes composants de la membrane plasmique, son internalisation a été quantifiée par cytométrie en flux, dans les cellules CHO K1 (WT) et CHO 745, déficientes en HS et CS. La Figure 59 montre que le conjugué est environ trois fois moins internalisé dans les cellules CHO 745 par rapport aux cellules CHO K1. La différence d'internalisation entre les conjugués (R/W)9-

AS1-TR et (R/W)9-AS2-TR ne semble donc pas être dû à une différence d'interaction avec les GAG membranaires.

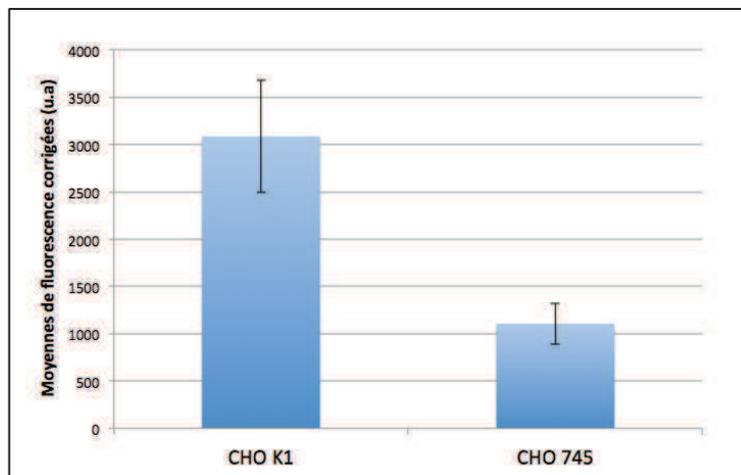


Figure 59 : Comparaison de l'internalisation du conjugué (R/W)9-AS1-TR dans les cellules CHOK1 et dans les cellules CHO745.

Les cellules CHO ont été traitées pendant 4h avec le conjugué à 1 μ M puis la fluorescence du Texas Red a été quantifiée par cytométrie en flux. Les moyennes de fluorescence obtenues ont été corrigées par les valeurs obtenues pour les cellules traitées avec le PNA AS2-TR.

Enfin, nous avons étudié l'influence de la chloroquine sur la quantité de conjugué internalisé dans les cellules HeLa. Nous avons montré dans l'article que l'internalisation du conjugué (R/W)9-AS2-TR est stimulée d'un facteur quatre en présence de CQ. Le co-traitement des cellules pendant 4h en présence du conjugué (R/W)9-AS1-TR et de 150 μ M de CQ, suivi de la mesure de fluorescence par cytométrie en flux, met en évidence une exaltation du même ordre (d'un facteur cinq) de l'internalisation pour ce conjugué (Figure 60). Des résultats similaires sont obtenus pour le conjugué (K/W)9-AS2-TR (Figure 60).

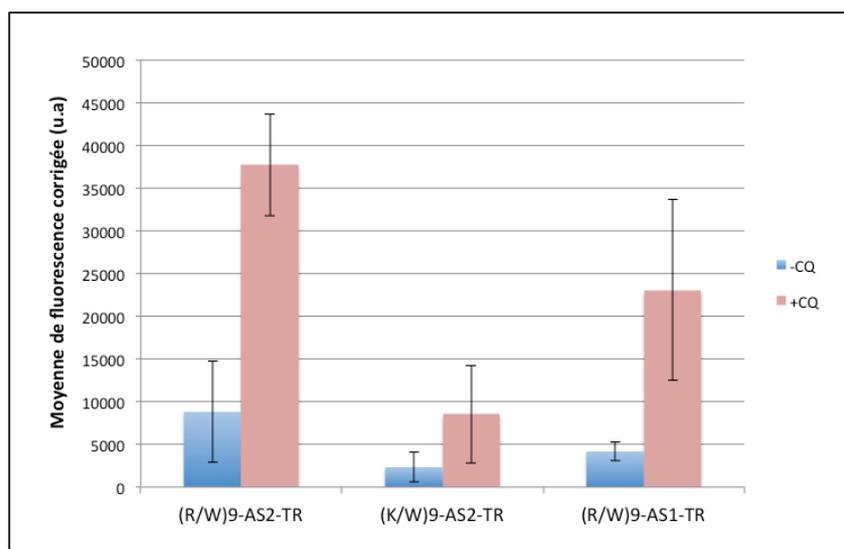


Figure 60 : Effet du co-traitement des cellules HeLa 1002 avec les différents conjugués CPP-PNA-TR et la chloroquine (CQ).

Les cellules HeLa ont été traitées pendant 4h avec 1 μ M du conjugué indiqué, en présence ou en absence de 150 μ M de chloroquine (CQ). La fluorescence émise par le Texas Red est ensuite quantifiée par cytométrie en flux et corrigée par la valeur obtenue pour les cellules traitées dans les mêmes conditions avec le PNA AS2-TR.

1. 4. Etudes complémentaires

a) Profils de marquage dans les cellules HeLa non perméabilisées vs perméabilisées

Les images de microscopie présentée sur la Figure 61 mettent en évidence le marquage vésiculaire observée pour les conjugués (R/W)9-AS2-TR et (K/W)9-AS2-TR, au bout de 4h d'incubation dans l'opti-MEM. Le PNA AS2 conjugué simplement au TR montre une internalisation quasiment nulle. La fluorescence associée au conjugué (K/W)9-AS2-TR est beaucoup moins intense que celle observée avec le conjugué (R/W)9-AS2-TR, et le nombre de vésicules fluorescentes est également réduit.

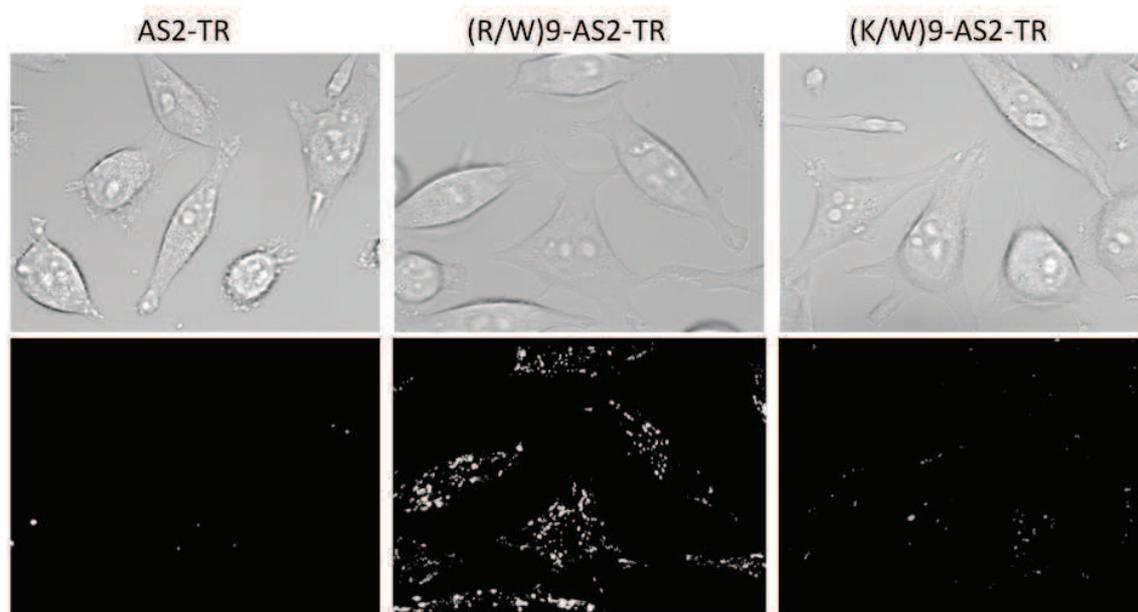


Figure 61 : Internalisation cellulaire des conjugués (R/W)9-AS2-TR et (K/W)9-AS2-TR dans les cellules HeLa 1002.

Les cellules ont été traitées pendant 4h avec 1 μ M du conjugué indiqué ou du PNA AS2-TR dans l'opti-MEM. Le milieu a ensuite été remplacé par de l'HBSS pour l'observation avec le microscope Zeiss Axio Observer Z1. Temps d'exposition : 100 ms pour les conjugués (R/W)9- et (K/W)9-AS2-TR ; 300 ms pour le contrôle AS2-TR.

Ce marquage vésiculaire correspond à une séquestration des conjugués dans les endosomes, très probablement à l'origine de l'absence d'activité biologique des PNA après pénétration libre en absence de chloroquine. La perméabilisation des cellules par la SLO induit la formation de pores d'environ 30 nm de diamètre dans la membrane plasmique. Ces pores sont donc supposés laisser les conjugués circuler librement du milieu extérieur vers le cytosol et un marquage diffus est donc attendu en microscopie. Pour connaître le type de marquage associé à une activité biologique des PNA et conjugués, nous avons donc observé les cellules perméabilisées à la SLO en présence des conjugués fluorescents (R/W)9-AS2-TR et (K/W)9-AS2-TR. Un marquage toujours majoritairement vésiculaire a été mis en évidence dans ces conditions, pour les deux conjugués. Un très léger marquage nucléaire est également observé dans certaines cellules (non visible sur les images). Nous avons montré dans l'article que l'activité des conjugués (R/W)9-AS2 et (K/W)9-AS2 dans les cellules perméabilisées à la SLO est la même pour les deux conjugués (environ 70% d'inhibition), et qu'elle est équivalente à celle du PNA AS2 nu. Nous avons vérifié que les même quantités de conjugués sont internalisées dans les cellules perméabilisées, en mesurant par cytométrie en flux l'internalisation des conjugués marqués au Texas Red (Figure 62A, histogramme). En effet, une quantité égale de fluorescence est associée aux deux conjugués. La Figure 62B montre les

valeurs d'activité luciférase obtenues pour ces conjugués-TR dans les cellules perméabilisées. L'activité est fortement réduite dans le cas des conjugués possédant un groupement TR (environ 40% d'inhibition de l'activité luciférase), en comparaison à l'activité des conjugués sans le TR. Il n'est donc pas exclu que la fluorescence cytoplasmique diffuse soit plus importante pour les conjugués sans le TR, et qu'elle soit responsable de l'activité biologique supérieure.

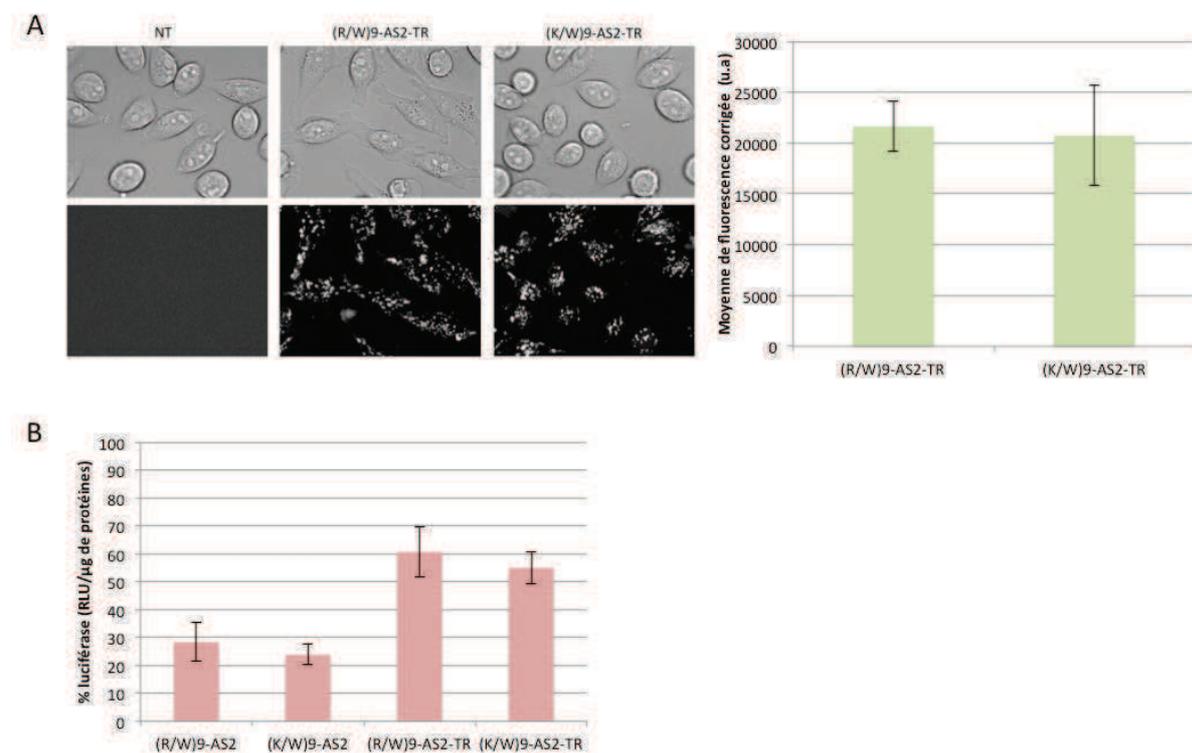


Figure 62 : Perméabilisation par la SLO des cellules HeLa 1002 en présence des conjugués (R/W)9-AS2-TR et (K/W)9-AS2-TR.

$2,6 \times 10^5$ cellules ont été incubées 15 min en présence de SLO et du conjugué indiqué. L'ajout de milieu DMEM+SVF permet la neutralisation de la SLO et l'obturation des pores. L'activité luciférase et les acquisitions en microscopie de fluorescence ont été réalisées 24h après induction de l'expression de la luciférase par la doxycycline. Les concentrations en oligomères dans le volume final après neutralisation sont de 1 μ M.

b) Comparaison de l'efficacité de différents agents lysosomotropiques

Nous avons utilisé d'autres agents lysosomotropiques afin de destabiliser les vésicules d'endocytose, tels que le chlorure de calcium (CaCl_2) et le sucrose. Ces molécules ont déjà été décrites dans la littérature pour libérer des conjugués CPP-PNA des endosomes (Abes, Williams, et al. 2006; Torres et al. 2011; Shiraishi & Nielsen 2006a; Shiraishi et al. 2005). Tout comme la chloroquine, ces molécules s'accumulent dans les vésicules acides et

provoquent leur lyse osmotique. L'effet du co-traitement de ces molécules avec le conjugué (R/W)9-AS1-TR en internalisation libre a tout d'abord été observé en microscopie de fluorescence (Figure 63). L'effet de la chloroquine sur l'internalisation de ce conjugué est visiblement le même que pour le conjugué (R/W)9-AS2-TR, c'est-à-dire une augmentation de la taille des vésicules d'endocytose. Le sucrose semble avoir le même effet, mais de manière moins efficace, l'aspect des vésicules étant le même avec une fluorescence moins forte. Le co-traitement avec du chlorure de calcium induit un profil différent, sans augmentation de la taille des vésicules mais avec un marquage nucléaire beaucoup plus prononcé.

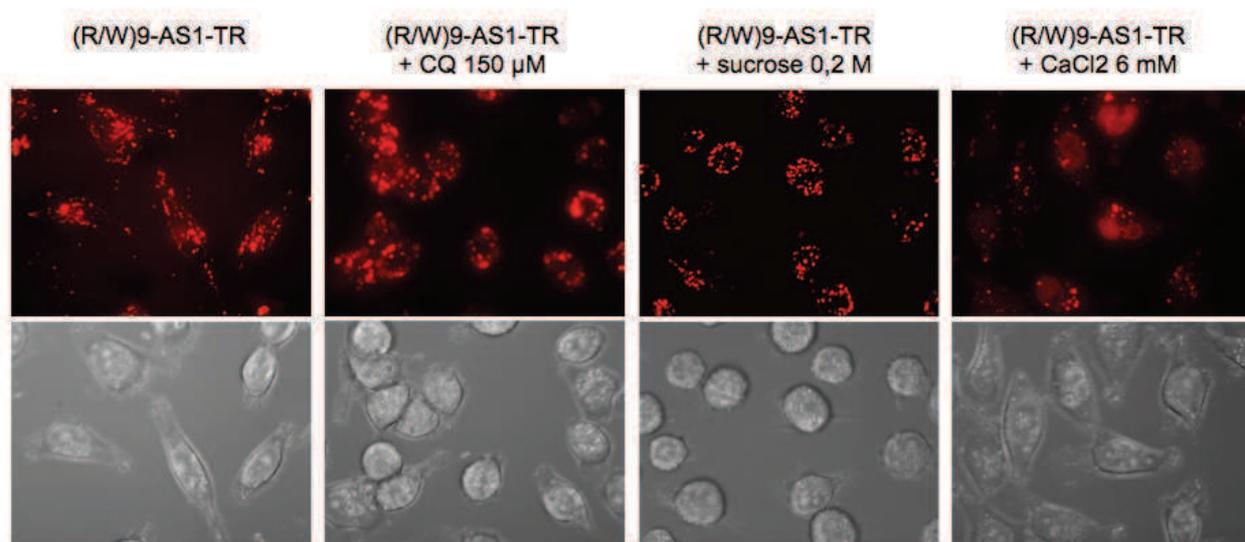


Figure 63 : Internalisation cellulaire du conjugué (R/W)9-AS1-TR dans les cellules HeLa 1002, en présence de différents agents lysosomotropiques.

40 000 cellules /puits ont étéensemencées la veille du traitement dans une microchambre IBIDI. Les cellules ont été traitées pendant 4h dans de l'opti-MEM en présence du conjugué (R/W)9-AS1-TR à 1 µM et de chloroquine (CQ), sucrose ou CaCl₂ aux concentrations indiquées. Le milieu est ensuite remplacé par de l'HBSS pour observation au microscope à fluorescence Zeiss.

L'originalité du profil de fluorescence observé en présence de 6 mM de CaCl₂ nous a conduit à investiguer l'activité biologique du conjugué (R/W)9-AS2 en pénétration libre en présence de CaCl₂. La concentration de 6 mM a tout d'abord été testée, car elle correspond à la concentration généralement employée dans la littérature pour les PNA (Torres et al. 2011; Shiraishi & Nielsen 2006a) et à la concentration que nous avons testé en microscopie (Figure 64) et pour laquelle une internalisation nucléaire est observée. A cette concentration aucune inhibition de l'activité luciférase n'a été obtenue. Nous avons donc augmenté la concentration

en CaCl_2 à 11 mM et 18 mM. A 11 mM aucune inhibition de la luciférase n'est observée (non montré). A 18 mM, une inhibition de près de 40% est observée. Cependant, cette expérience n'a été réalisée qu'une fois et le contrôle correspondant au PNA AS2 nu inhibe également l'activité de la luciférase (30% d'inhibition). Cette expérience est donc à reproduire pour pouvoir réellement conclure sur l'efficacité du calcium pour potentialiser l'activité de nos conjugués dans ce système.

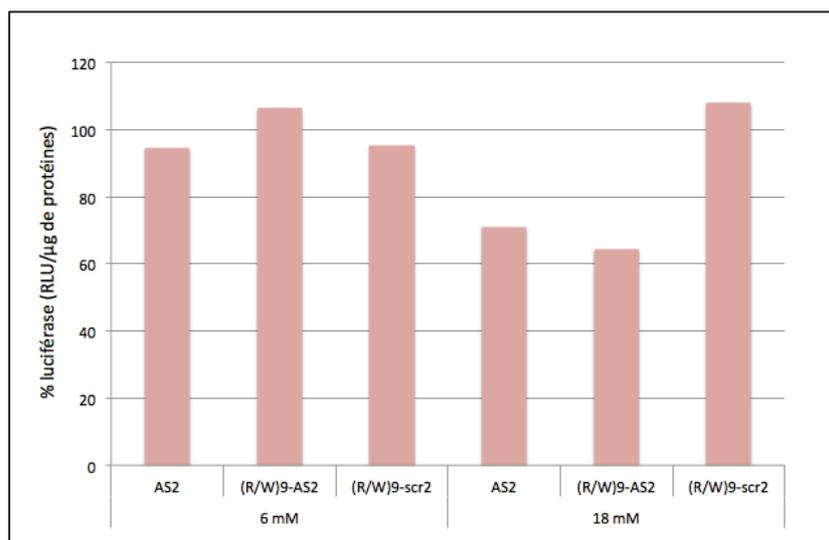


Figure 64 : Activités luciférase après internalisation libre du conjugué (R/W)9-AS2 en présence de CaCl_2 . Les cellules HeLa 1002 sont traitées pendant 4h en présence du PNA AS2, du conjugué (R/W)9-AS2 ou du conjugué (R/W)9-scr2, en présence de 6 ou 18 mM de CaCl_2 . L'activité luciférase est mesurée 43h après induction de l'expression de la luciférase par la doxycycline.

c) Observation des conjugués en microscopie confocale

Afin de s'assurer que la fluorescence observée au microscope correspond bien à un marquage intracellulaire, nous avons voulu observer l'internalisation des conjugués avec un microscope confocal. La microscopie confocale offre en effet une meilleure résolution et permet l'élimination du signal fluorescent provenant de plans focaux extérieurs à la cellule. Les cellules HeLa 1002 ont été traitées pendant 4h avec le conjugué (R/W)9-AS1-TR, en présence ou en absence de chloroquine, et les noyaux ont été marqués par le Hoechst. Afin de vérifier la viabilité des cellules observées, un colorant possédant une forte affinité pour les acides nucléiques (le SYTOX®green) et marquant le noyau des cellules mortes, est également ajouté aux cellules. Les images obtenues avec le microscope confocal LEICA TCS-SP2 sont présentées sur la Figure 65. En absence de chloroquine, le signal correspondant au Texas Red

est cytoplasmique et vésiculaire, attestant de la localisation du conjugué dans les endosomes. En présence de chloroquine, nous retrouvons bien le marquage déjà observé, avec des vésicules plus grosses et plus intenses, et un très léger signal cytoplasmique diffus, associé à un marquage du noyau dans certaines cellules. Le signal vert correspondant au marquage par le colorant vital SYTOX®green. Aucun marquage nucléaire n'est observé dans le vert, indiquant que les cellules sont vivantes. Un marquage ponctuel est observé, résultant possiblement de l'internalisation du colorant par endocytose dans les cellules vivantes.

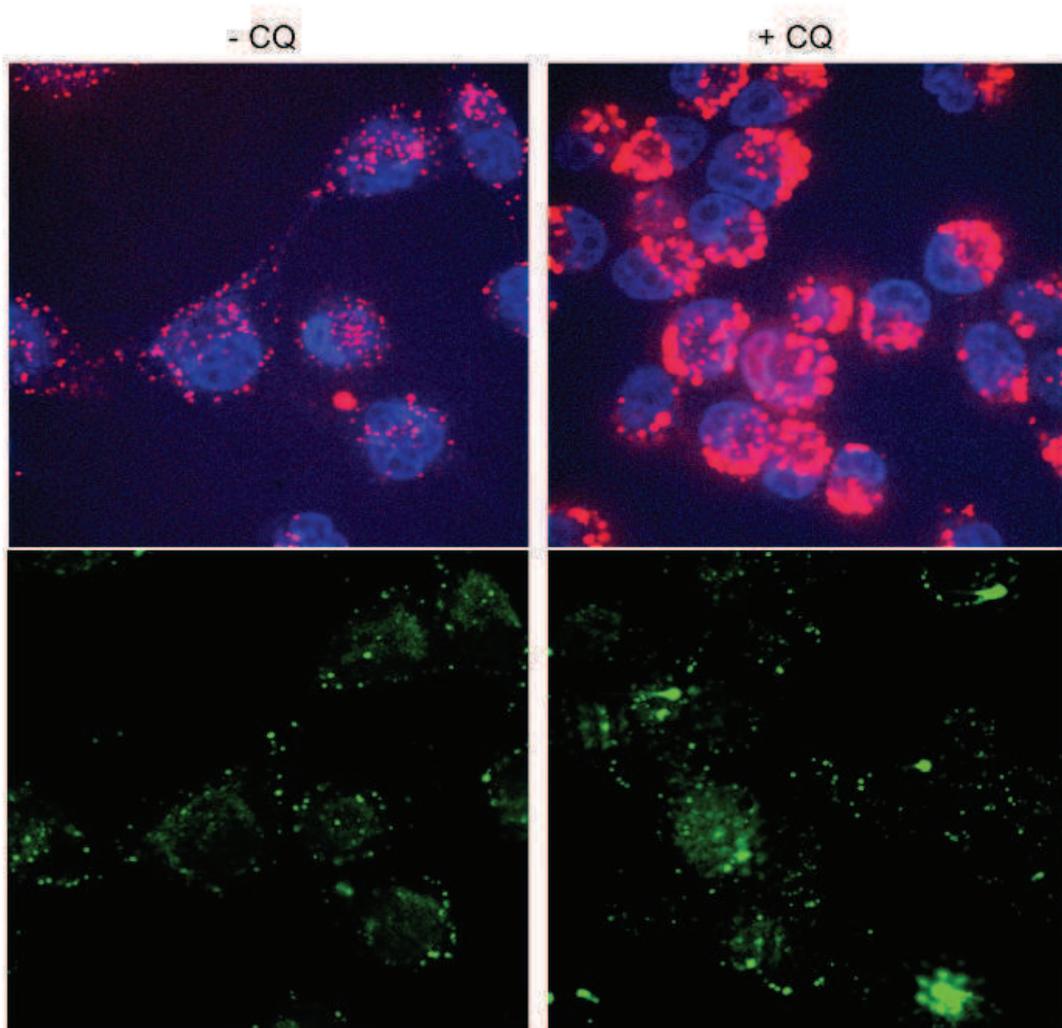


Figure 65 : Observation en microscopie confocale, de cellules HeLa 1002 co-traitées pendant 4h avec le conjugué (R/W)9-AS1-TR et la chloroquine (CQ).

Les cellules sont traitées pendant 4h avec 1 μM de conjugué (R/W)9-AS1-TR, en présence ou non de 100 μM de chloroquine (CQ). 30 min avant la fin de l'incubation, 200 ng/ml de Hoechst et 0,5 μM de Sytoxgreen sont ajoutés pour le marquage des noyaux et la détection des cellules mortes, respectivement. Les images du haut représentent la superposition des signaux obtenus pour le Hoechst et le Texas Red et les images du bas représentent le signal de SYTOX®green correspondant aux mêmes cellules. Bleu : Hoechst ; Rouge : conjugué-TR ; Vert : SYTOX®green

Afin de savoir si l'implication de l'endocytose comme mécanisme principal d'internalisation de nos conjugués est dépendante de la concentration en conjugués, nous avons réalisé une étude de l'internalisation du conjugué (R/W)9-AS1-TR dans les cellules HeLa à différentes concentrations (0,1 – 0,5 – 1 μM). Les images obtenues en microscopie confocale sont présentées Figure 66A. On observe que le PNA AS1 sans peptide n'est pas internalisé. Le signal correspondant au conjugué est vésiculaire et cytoplasmique dès 0,1 μM en conjugué, et le nombre de vésicules augmente avec la concentration. La Figure 66B présente l'image obtenue pour 1 μM en conjugué, et l'image associée correspondant au signal vert du SYTOX®green. Les noyaux des cellules (positionnés par les flèches blanches) ne sont pas marqués par le colorant, témoignant d'une viabilité cellulaire non altérée en présence de 1 μM de conjugué.

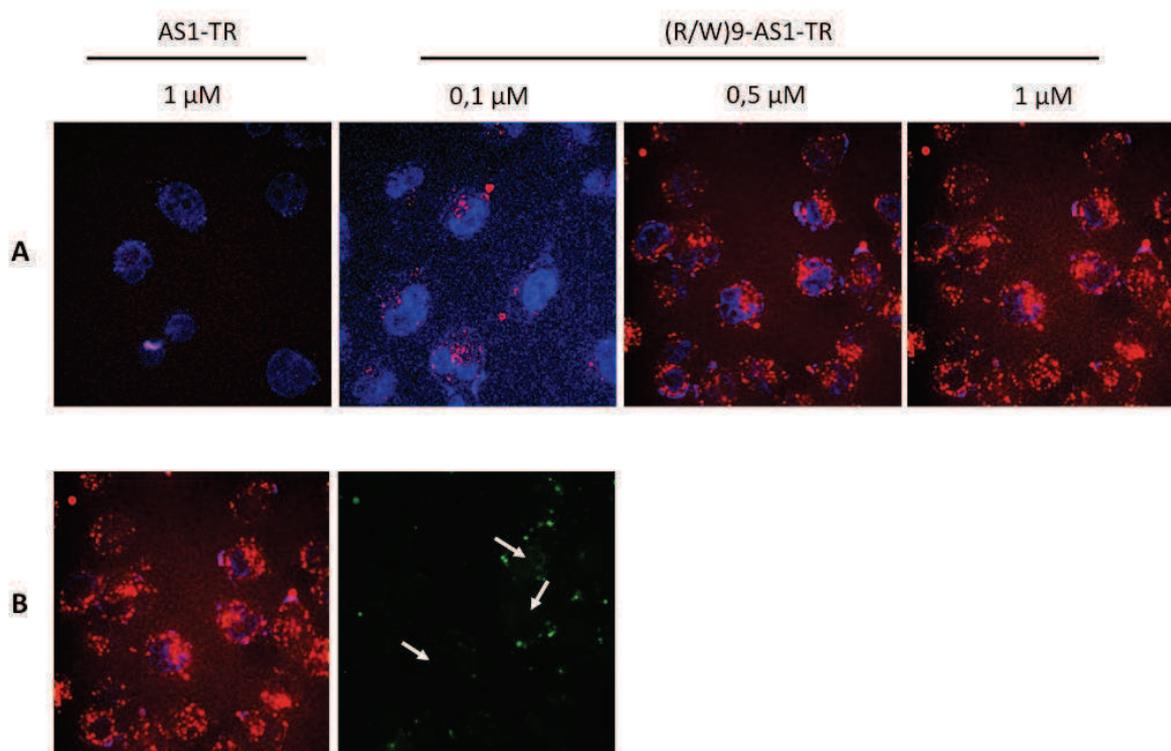


Figure 66 : Effets de la concentration du conjugué (R/W)9-AS1-TR sur l'internalisation dans les cellules HeLa 1002.

Les cellules HeLa 1002 ont été traitées avec les concentrations indiquées de PNA AS1-TR ou de conjugué (R/W)9-AS1-TR pendant 1h à 37°C. 200 ng/ml de Hoechst pour la coloration des noyaux et 0,5 μM de Sytoxgreen pour la détection des cellules mortes, sont ajoutés 30 min avant l'observation en microscopie confocale. A. Superposition des signaux correspondants au Hoechst (noyaux ; bleu) et au Texas Red (rouge). B. Marquage du sytoxgreen (vert) correspondant à l'image obtenue pour le traitement avec 1 μM de conjugué (R/W)9-AS1-TR. Les flèches blanches indiquent la position des noyaux.

II. 2. Internalisation du PNA C-13 dirigé contre l'ARNm de l'IGF1R dans les cellules DU145 par le CPP (R/W)9

Le PNA C-13, sélectionné sur la base de l'activité biologique *in vitro* et *in cellulo* (voir Chapitre I) a été conjugué par pont disulfure au CPP (R/W)9, afin de permettre son internalisation dans les cellules humaines.

La première étape a été de vérifier que ce conjugué inhibe la traduction d'IGF1R- β dans les cellules DU145 transfectées par nucléofection. Une nucléofection en présence du conjugué (R/W)9-C13, du PNA C-13 nu, du PNA 959 ou du PNA *scramble* 13-mer scr1 a donc été réalisée, suivie d'un western blot 48 heures post-transfection. La Figure 67 présente deux expériences indépendantes, montrant que l'activité du conjugué pour l'inhibition de la traduction d'IGF1R- β est légèrement plus faible que celle du PNA C-13 nu. Les inhibitions obtenues avec le conjugué (R/W)9-C13 dans les cellules transfectées sont donc comprises entre 30 et 50%.

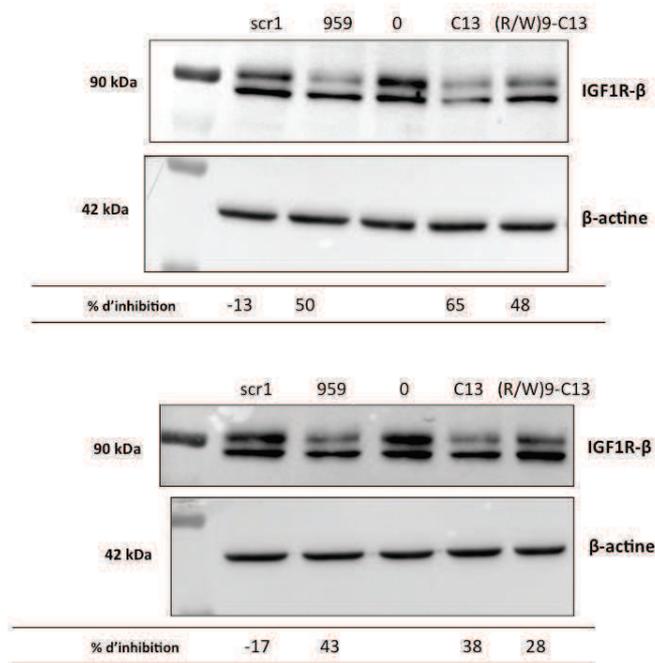


Figure 67 : Expression d'IGF1R- β dans les cellules DU145 électroporées en présence des PNA indiqués ou du conjugué (R/W)9-C13.

Les cellules DU145 ont été électroporées en présence des PNA indiqués ou du conjugué (R/W)9-C13 à 1 μ M, puis un western blot est réalisé sur les lysats cellulaires 48h après transfection. L'expression d'IGF1R- β (90 kDa) est révélée par l'anticorps C20. La quantité de protéines déposée dans chaque puits est normalisée par révélation de la β -actine (42 kDa). Sous chaque puits est indiqué le % d'inhibition d'IGF1R- β par rapport aux cellules électroporées sans PNA (point 0).

Avant d'étudier l'internalisation libre du conjugué dans les cellules DU145 en présence de chloroquine, nous avons voulu vérifier que la chloroquine exerce le même effet que celui observé dans les cellules HeLa 1002 avec les conjugués (R/W)9-PNA-TR. Pour cela, nous avons visualisé en microscopie de fluorescence, l'internalisation du conjugué (R/W)9-AS2-TR dans les cellules DU145 en présence et en absence de chloroquine. L'effet de la chloroquine sur l'internalisation est similaire à celui observé dans les cellules HeLa, c'est-à-dire une augmentation de la taille des vésicules contenant le conjugué (Figure 68).

Le co-traitement des cellules DU145 avec le conjugué (R/W)9-C13 et la chloroquine pendant 4h, conduit à une inhibition de l'expression d'IGF1R- β d'environ 80%, après 48h de culture post-traitement (Figure 69). Ce résultat est à confirmer en reproduisant l'expérience, et en ajoutant le PNA C-13 nu, à la même concentration, pour vérifier que l'inhibition est bien due à l'augmentation de l'internalisation résultant de la conjugaison avec le CPP.

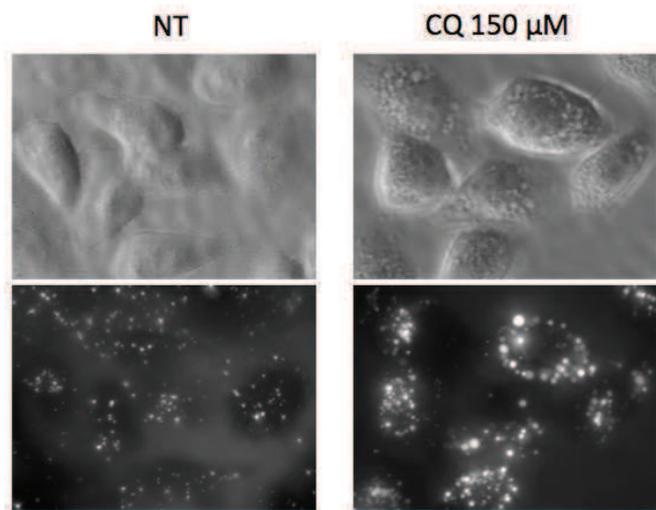


Figure 68 : Internalisation du conjugué (R/W)9-AS2-TR dans les cellules DU145 en absence (NT) ou en présence de 150 μ M de chloroquine (CQ).

50 000 cellulesensemencées la veille de l'expérience ont été traitées pendant 4h avec le conjugué (R/W)9-AS2-TR à 1,5 μ M, en présence ou non de 150 μ M de CQ. Le milieu de traitement est ensuite remplacé par de l'HBSS pour observation avec un microscope à fluorescence (Leica DMIRE2).

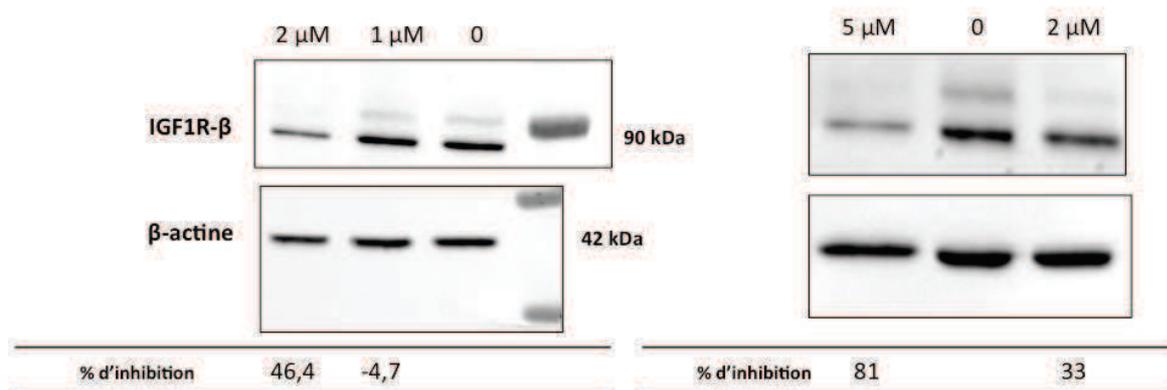


Figure 69 : Expression d'IGF1R-β dans les cellules DU145 traitées avec le conjugué (R/W)9-C13.

Les cellules DU145 ont été traitées pendant 4h avec le conjugué (R/W)9-C13 aux concentrations indiquées, en opti-MEM en présence de 150 μM de chloroquine et cultivées pendant 48h dans du milieu RPMI 10% SVF. Un western blot est ensuite réalisé sur les lysats cellulaires, et l'expression d'IGF1R-β (90 kDa) est révélée par l'anticorps C20. La quantité de protéines déposée dans chaque puits est normalisée par révélation de la β-actine (42 kDa). Sous chaque puits est indiqué le % d'inhibition d'IGF1R-β par rapport aux cellules électroporées sans PNA (point 0).

II. 3. Discussion

Internalisation des PNA initiée par le CPP (R/W)9

Nos résultats ont montré que le conjugué (R/W)9-AS2-TR atteint une internalisation maximale deux heures après ajout dans le milieu de culture des cellules HeLa et que la quantité internalisée reste stable pendant au moins six heures. Le conjugué interagit avec les GAG membranaires et son mécanisme d'internalisation dans les cellules HeLa implique majoritairement l'endocytose, la pénétration étant très fortement diminuée à 4°C ou en présence d'inhibiteurs d'ATP. Ces résultats sont en accord avec ceux mesurés dans des cellules CHO K1 et CHO 745 pour le peptide seul en utilisant une technique indépendante de la fluorescence (Delaroche et al. 2007; Walrant et al. 2011).

Nous avons montré par des expériences de colocalisations avec des marqueurs spécifiques de différentes voies d'endocytose que plusieurs voies de pinocytose (macropinocytose, endocytose dépendante de la clathrine et endocytose indépendante de la clathrine) sont simultanément empruntées par le conjugué (R/W)9-AS2-TR. Cependant, tout comme pour les inhibiteurs chimiques des voies d'endocytose, la spécificité des marqueurs fluorescents a été contestée, ceux-ci pouvant être internalisés par plusieurs voies dans certaines lignées cellulaires (Vercauteren et al. 2010). Il serait donc nécessaire de confirmer ces résultats par des expériences d'inhibition de protéines spécifiquement impliquées dans

chacune des voies par l'utilisation d'ARN interférents. Seule la combinaison des différentes approches apporte des informations fiables sur la nature des voies d'endocytose impliquées. L'internalisation par ces différentes voies de pinocytose aboutit à la localisation du conjugué dans les endosomes puis dans les lysosomes, comme en atteste sa colocalisation avec le lysotracker. Un avantage d'une internalisation par endocytose pourrait être le contournement des mécanismes d'export allant à l'encontre d'une internalisation par translocation directe. L'inconvénient majeur repose sur la séquestration endosomale et la nécessité de libération des molécules dans le cytosol avant leur dégradation dans les lysosomes.

Effets de la chloroquine

L'observation microscopique des cellules co-traitées avec le conjugué (R/W)9-PNA-TR et la chloroquine a mis en évidence une augmentation du volume des endosomes et/ou lysosomes contenant le conjugué. En effet, la chloroquine est un agent lysosomotropique bien connu qui pénètre et s'accumule dans les compartiments intracellulaires acides, tels que les lysosomes, entraînant une consommation de protons et un influx de contre-ions et d'eau par osmose. Une dilatation des lysosomes, voire même leur rupture sous l'effet de la pression osmotique est alors observée. De plus, le pH des lysosomes augmente de 4-4,5 à 6, ce qui rend inactives la plupart des enzymes lysosomales (Zhang & Mallapragada 2011). A travers son effet sur les lysosomes, la chloroquine peut également jouer un rôle dans l'autophagie, qui est un processus cellulaire vital, consistant en la dégradation de certains constituants cellulaires par les lysosomes, tels le réticulum endoplasmique ou les mitochondries (Yoon et al. 2010). La fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, qui est l'étape finale du processus d'autophagie, est inhibée par le traitement à la chloroquine (Yoon et al. 2010).

Les tests d'activité biologique des conjugués suite à la pénétration libre des conjugués dans les cellules HeLa 1002 ont mis en évidence la nécessité d'un co-traitement par la chloroquine pour l'efficacité des PNA AS1 et AS2. L'utilisation de la chloroquine à des concentrations allant de 100 à 150 μ M pour potentialiser l'activité des PNA est couramment rapportée dans la littérature (Abes, Williams, et al. 2006; Turner et al. 2005; Abes et al. 2007). Cet effet est attribué à l'échappement endosomal induit par la chloroquine. De façon surprenante, la quantification en cytométrie en flux de l'internalisation du conjugué (R/W)9-AS2-TR a mis en évidence une augmentation d'un facteur quatre en présence de chloroquine. Contrairement à nos résultats, des études de quantifications rapportées dans la littérature n'ont mis en évidence aucune augmentation de l'internalisation en présence de chloroquine (Caron

et al. 2004; Laufer & Restle 2008). Des études supplémentaires devront être réalisées afin de comprendre cet effet non conventionnel de la chloroquine.

Lysines vs arginines

Nous avons montré que le PNA AS2 est six fois moins internalisé par l'analogue (K/W)₉ que par le peptide (R/W)₉. Ceci résulte en l'absence d'activité biologique à 1,5 µM, dans des conditions où le conjugué (R/W)₉-AS2 inhibe d'environ 70% l'activité luciférase. Les arginines ont donc un rôle crucial pour promouvoir l'internalisation cellulaire. Les deux conjugués interagissent avec les GAG membranaires, leur internalisation étant réduite dans les cellules CHO 745.

La comparaison entre des homopolymères de lysines et d'arginines a permis de mettre en évidence l'importance des lysines pour l'internalisation (Mitchell et al. 2000). Les homopolymères de citrulline, comportant une urée à la place du groupement guanidinium ne sont pas internalisés, suggérant que le groupement guanidinium est un composant structural crucial pour l'internalisation, grâce aux liaisons hydrogènes bidentées qu'il peut former avec les groupements phosphates, carboxylates et sulfates de la membrane. Il est aujourd'hui clair que les CPP comportant un grand nombre de résidus arginine sont plus efficaces que leurs analogues comportant des lysines, malgré la même charge nette positive (Amand et al. 2008; Thorén et al. 2003; Amand et al. 2012). Une étude récente a montré que l'affinité membranaire supérieure de l'analogue PenArg (avec des arginines à la place des lysines dans la séquence de la pénétratine) est à l'origine de l'augmentation de son internalisation en comparaison à l'analogue PenLys (lysines à la place des arginines). Des expériences de DLS (Dynamic Light Scattering) ont mis en évidence que la richesse en arginines augmente la capacité du peptide à fixer et l'héparine et à former des agrégats (Amand et al. 2012). L'induction de la formation de *clusters* après fixation du peptide aux GAG membranaires pourrait donc être le facteur qui augmente l'efficacité d'internalisation des peptides riches en arginines par rapport aux peptides riches en lysines. Des expériences de DLS avec nos conjugués en présence d'héparine pourraient permettre de confirmer cette hypothèse.

Importance du pont disulfure dans l'internalisation

L'implication du pont disulfure dans des échanges avec des thiols membranaires, influant sur l'efficacité de l'internalisation a été évaluée par comparaison avec l'activité du même conjugué, formé avec une liaison maléimide, non labile. Nous ne disposons pas du conjugué maléimide marqué avec le Texas Red et n'avons donc pas pu directement comparer

les quantités internalisées. Toutefois, l'activité biologique d'inhibition de l'activité luciférase mesurée pour ce conjugué maléimide est légèrement supérieure à celle obtenue pour le conjugué disulfidique, suggérant une faible influence du pont disulfure sur la quantité de conjugué internalisé.

Cette étude met également en évidence le fait qu'une liaison clivable permettant la libération du PNA dans le cytoplasme n'est pas requise pour l'activité biologique. Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans d'autres études (Wolf et al. 2006). Une limite à cette conclusion est que nous ignorons l'état réel de réduction du pont disulfure et le degré de dégradation du peptide dans la cellule.

Méthodes de quantification

L'évaluation de l'internalisation de nos conjugués repose sur des observations microscopiques en cellules vivantes ou des quantifications en cytométrie en flux, de la fluorescence associée au Texas Red. L'inconvénient majeur de cette technique d'étude est que l'ajout d'un groupement fluorophore sur le conjugué peut modifier les propriétés physico-chimiques de ce dernier et influencer positivement ou négativement son internalisation. En effet, les fluorophores sont des groupements généralement hydrophobes qui peuvent modifier l'interaction avec la membrane plasmique, augmenter ou diminuer l'internalisation, et/ou modifier la localisation cellulaire du conjugué. De plus, un *quenching* de la fluorescence peut se produire, résultant du transit de la molécule dans des compartiments où le pH peut modifier les propriétés de fluorescence, ou de l'interaction transitoire avec des partenaires cellulaires, conduisant à une mauvaise évaluation de l'internalisation (Bechara & Sagan 2013). Notre choix du Texas Red comme fluorophore dont la fluorescence ne varie pas selon le pH devrait limiter ce biais. Une technique de quantification par spectrométrie de masse MALDI-TOF de l'internalisation des peptides permet de s'affranchir de l'utilisation d'un fluorophore. Cette technique permet la quantification directe de l'internalisation cellulaire d'un peptide comportant une étiquette biotinyllée en N-terminal (¹H-peptide), en comparaison à un peptide standard interne comportant la même étiquette biotinyllée et bi-deutérée (²H-peptide), dont une quantité connue est ajoutée après la lyse des cellules, au moment de la mesure (Aubry et al. 2010). L'avantage supplémentaire de cette technique très sensible (sensibilité de l'ordre de la femtomole) est qu'elle permet de distinguer les formes intracellulaires intactes et dégradées des peptides. En revanche, elle ne permet pas d'étudier la localisation cellulaire des molécules.

Un autre point important, pouvant être à l'origine d'une surestimation de la quantité intracellulaire de conjugué, est la fixation à la membrane plasmique. L'élimination des

conjugués fixés à la membrane doit donc être une étape préalable à la quantification. Dans ce but, les protocoles de quantification incluent généralement un traitement avec la trypsine ou la pronase et/ou des lavages en présence d'héparine ou de *quencher*s de fluorescence. Avant quantification de la fluorescence par cytométrie en flux, nos cellules sont trypsinées pendant 10 min à 37°C, ceci étant suivi de plusieurs lavages. La trypsine clivant préférentiellement après les résidus lysines et arginines, ce traitement devrait en principe permettre d'éliminer la majorité des conjugués restés fixés à la membrane. Il n'est cependant pas exclu que les produits de clivage par la trypsine conservent une affinité pour la membrane.

Importance d'un test fonctionnel

Tous ces biais dans l'évaluation de l'internalisation sont éliminés par la mesure d'une activité biologique associée à la molécule bioactive, résultant de l'interaction avec une cible intracellulaire. Il a été montré que les observations et les mesures de fluorescence ne sont pas toujours corrélées à la quantité réelle de molécule bioactive ayant accès à sa cible (Koller et al. 2011). Pour cette raison, seuls des tests fonctionnels permettent d'évaluer fidèlement l'efficacité d'une internalisation dans le compartiment cellulaire compatible avec l'activité de la molécule.

Pour évaluer l'activité biologique nucléaire des oligonucléotides antisens bloqueurs stériques, de nombreuses équipes utilisent un système rapporteur d'activité de correction d'épissage, développé par Kole (Kang et al. 1998; Said Hassane et al. 2010). La lignée HeLa pLuc 705 a été stablement transfectée avec une construction comportant le gène de la luciférase, interrompu par l'intron 2 muté du gène de la β -globine (IVS2-705). Une substitution de T par G en position 705 de l'intron, génère un site d'épissage 5' additionnel et active un site cryptique 3', 126 nucléotides en amont. Ceci résulte en la rétention de l'intron lors de l'épissage, dans l'ARN pré-messager et induit l'apparition d'un codon stop interférant avec la traduction de la luciférase (Figure 70). Le ciblage des sites aberrants d'épissage par des oligonucléotides bloqueurs stériques permet de restaurer l'épissage correct, aboutissant à l'expression d'une luciférase fonctionnelle (El-andaloussi et al. 2006).

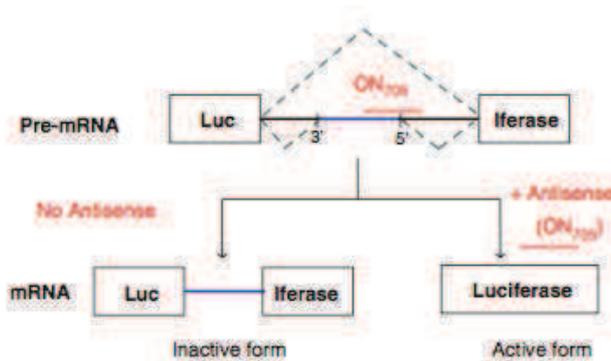


Figure 70 : Système rapporteur d'activité de correction d'épissage par les oligonucléotides antisens dans le noyau (d'après Said Hassane et al. 2010).

La lignée cellulaire HeLa pLuc 705 exprime stablement cette construction comportant la séquence codante de la luciférase, interrompue par un intron muté du gène de la β -globine. Cette séquence intronique porte deux sites aberrants d'épissage, résultant en la rétention d'une partie de l'intron dans l'ARNm épissé. Le ciblage de ces sites aberrants par un oligonucléotide antisens permet la redirection de l'épissage et la production d'une luciférase active.

Ce test d'activité rend compte de la présence de l'oligonucléotide dans le noyau. Notre test d'inhibition de la traduction du gène rapporteur de la luciférase permet d'évaluer une activité cytoplasmique et constitue donc une alternative au système rapporteur de Kole. La détection en positif de la production de la luciférase dans le système de Kole permet toutefois d'obtenir une sensibilité plus importante que dans le cas de mesures d'inhibitions comme c'est le cas dans notre test.

Les activités biologiques mesurées avec nos conjugués en présence de chloroquine sont corrélées avec les observations microscopiques et quantifications de la fluorescence. En effet, les conjugués (K/W)9-AS2-TR sont internalisés en moindre quantité et n'inhibent pas l'activité luciférase.

Internalisation Photochimique

Nous avons montré que l'irradiation à 545 nm des cellules HeLa pré-traitées avec le conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA induit la photo-libération du conjugué des vésicules d'endocytose vers le cytoplasme et le noyau en quelques minutes. Cette cinétique de relocalisation est similaire à celle observée dans d'autres études avec des conjugués TAMRA-PNA-transporteur (Bøe et al. 2011; Marlin et al. 2012). La fluorescence observée en microscopie dans le cytosol et le noyau est plus importante que celle observée dans ces mêmes compartiments après co-traitement des cellules avec la chloroquine, et pourtant aucune activité biologique n'a été obtenue. Ceci soulève la question de l'intégrité du PNA

après la photo-libération, sa proximité avec la TAMRA pouvant éventuellement l'exposer aux espèces oxydantes générées. Pourtant, les conditions d'irradiation testées (puissance de 11 à 270 mW/cm², durées de 5 à 30 min) correspondent à des conditions compatibles avec la libération et l'activité de conjugués TAMRA-PNA-peptides, pour lesquels une inhibition de 90% de la cible est obtenue après irradiation des cellules pendant 9 min à 11,5 mW/cm² (Bøe et al. 2011). Toutefois, une inhibition spécifique de l'ARNm par le conjugué est également observée dans cette étude, impliquant un mécanisme de répression pré-translationnelle. Les auteurs suggèrent que cet effet pourrait résulter de la fixation du PNA sur l'ADN et de l'inhibition de la transcription, ou de sa fixation sur l'ARN pré-messager, conduisant à un repliement de l'ARN qui induirait sa dégradation. Il n'est donc pas exclu que l'inhibition protéique observée résulte uniquement de cet effet pré-translationnel et donc de la présence du conjugué dans le noyau et non dans le cytoplasme. L'accumulation de la fluorescence dans le noyau observée après PCI serait en effet plus compatible avec une activité nucléaire du PNA.

Une exaltation de l'activité luciférase a été observée dans les cellules traitées avec nos conjugués (R/W)9-AS2-TAMRA ou (R/W)9-scr2-TAMRA et irradiées. Cet effet pourrait résulter d'une augmentation de l'expression de la luciférase dans les cellules irradiées en présence des conjugués TAMRA, ou simplement d'une exaltation de l'activité enzymatique de la luciférase dans ces cellules, suite à la présence lors de la mesure d'un composé dont la production aurait été induite. Des investigations supplémentaires seront nécessaires pour explorer le mécanisme à l'origine de cette exaltation. Il est intéressant de remarquer que les exaltations obtenues avec le conjugué *scramble* sont plus importantes que celles obtenues avec le conjugué AS2. Dans l'hypothèse où les exaltations de l'activité luciférase seraient dues uniquement à l'irradiation en présence de la TAMRA, l'inhibition induite par le conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA relative à l'activité du conjugué (R/W)9-scr2-TAMRA, pourrait refléter une activité biologique efficace.

La validité de l'approche PCI dans notre système a été confirmée par l'obtention d'une activité biologique avec le conjugué (R/W)9-AS2 en présence du photosensibilisateur phthalocyanine d'aluminium disulfonate (AlPcS_{2a}) et de l'irradiation des cellules à 650 nm. Toutefois, il est étonnant de constater que le conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA n'est pas actif dans ces mêmes conditions, alors qu'il est tout à fait actif dans les cellules perméabilisées. Cette approche classique de PCI a déjà démontrée dans le cadre de l'internalisation de conjugués PNA-CPP avec AlPcS_{2a} (Shiraishi & Nielsen 2006b) et avec TPPS_{2a} (tétraphénylporphine disulfonate) (Bøe & Hovig 2006). Cependant, la PCI induite par ces photosensibilisateurs génère une toxicité plus importante que l'approche avec la TAMRA

conjuguée à la molécule endocytosée (Bøe et al. 2011). Ceci est dû d'une part au fait que la TAMRA est un agent photosensibilisateur moins puissant, et d'autre part à la restriction des dommages oxydatifs membranaires aux sites contenant les conjugués, dans les cas où cette molécule est covalamment liée.

L'optimisation de cette approche utilisant un conjugué unique multifonctionnel, constitué d'un module permettant l'internalisation cellulaire (le CPP), de la molécule bioactive (le PNA) et d'un module pour l'échappement endosomal (le photosensibilisateur) serait donc intéressante, notamment en testant le couplage d'autres photosensibilisateurs que la TAMRA. Une considération importante pour l'application *in vivo* de cette stratégie, est le choix du photosensibilisateur selon sa longueur d'onde d'excitation. En effet, les longueurs d'ondes plus élevées ont une pénétration plus importante dans les tissus humains, ce qui permettrait de ne pas restreindre l'application à des lésions en surface. Par exemple, l'Amphinex qui est en développement clinique est excité à 652 nm, alors que les dérivés de la rhodamine sont excités à environ 550 nm (Bøe et al. 2011).

Conclusion générale et perspectives

Nos études ont mis en évidence la capacité unique des PNA parmi les autres bloqueurs stériques pour former des structures de type triplexe sur l'ARN et inhiber l'élongation de la traduction. Bien que leur spécificité reste à être déterminée, des courts PNA de 11 bases peuvent être efficaces pour arrêter les ribosomes en cours de traduction. Sur nos deux systèmes d'étude, l'augmentation de la taille des PNA ne conduit pas à l'augmentation de leur efficacité. Des progrès pour augmenter l'internalisation cellulaire des PNA sont attendus pour un développement clinique de ces bloqueurs stériques prometteurs dans les différentes applications. Certaines modifications chimiques dans la structure des PNA ont été développées afin d'apporter une solution à ce problème.

Les propriétés du groupement guanidinium de l'arginine pour promouvoir l'internalisation cellulaire ont été exploitées dans la conception de PNA guanidine (GPNA), comportant des groupements guanidinium dans leur squelette (Figure 71). Il a été montré que l'internalisation cellulaire de ces GPNA est similaire à celle du peptide Tat (Zhou et al. 2003). Cependant, cette modification modifie les propriétés de fixation des PNA en duplexe ou en triplexe sur l'ADN.

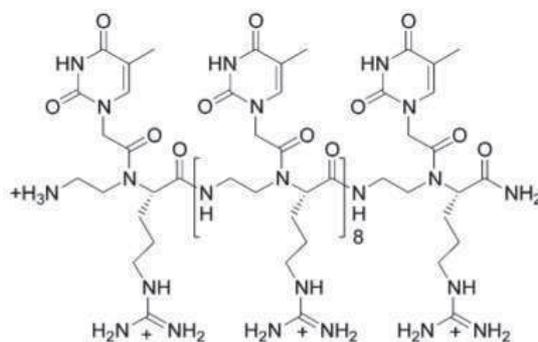


Figure 71 : Structure chimique d'un GPNA (T_g)₁₀ (d'après Zhou et al, 2003).

Une étude a récemment montré que la conjugaison de PNA à des molécules d'acide cholique (Figure 72) sont efficacement internalisés dans les cellules avec un lipide cationique,

atteignant ainsi une activité antisens de l'ordre du nanomolaire dans un test de correction d'épissage (Shiraishi & Nielsen 2012). L'efficacité de formation de ces lipoplexes s'explique par des interactions hydrophobes au niveau de la face hydrophobe de l'acide cholique.

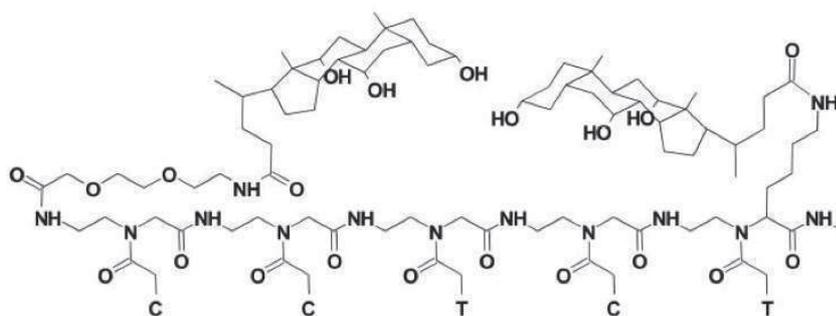


Figure 72 : Structure chimique des conjugués PNA-acide cholique (d'après Shiraishi et Nielsen, 2012).

Ces modifications sont complexes à synthétiser et modifient l'affinité et les propriétés de fixation des PNA sur l'ARN. La solution la plus prometteuse pour l'internalisation des PNA sans altérer leurs caractéristiques intrinsèques reste l'utilisation des CPP.

Nous avons montré que le peptide (R/W)9 est efficace pour internaliser les PNA dans les cellules. Notre étude apporte des éléments nouveaux dans la caractérisation de ce peptide, en mettant en évidence l'importance des résidus arginines pour l'internalisation cellulaire, le rôle des tryptophanes ayant déjà été étudié (Walrant et al. 2011; Walrant et al. 2012). En revanche, comme pour la plupart des CPP, l'induction de la libération dans le cytoplasme à partir des endosomes par une approche chimique (par exemple la chloroquine) ou photochimique (la PCI) est nécessaire pour obtenir une activité biologique.

L'utilisation de la chloroquine pour des applications *in vivo* pose la question de ses effets sur l'organisme et sur sa toxicité. Cette molécule de la famille des amino-4-quinoléines est un antipaludique utilisé en traitement préventif et curatif chez les patients à des doses allant jusqu'à 10 mg/kg. Son mécanisme d'action dans le traitement du paludisme n'est pas complètement élucidé mais sa liaison à la ferriprotoporphyrine IX, formant un complexe toxique pour le parasite dans les hématies infectées serait à l'origine de son efficacité sur le stade érythrocytaire du développement du parasite (Fitch 1989). *In vivo*, un co-traitement par des acides nucléiques ou analogues thérapeutiques et la chloroquine pour un effet endosomolytique est donc envisageable. Cette stratégie est d'ailleurs développée en

préclinique dans le cadre du traitement par des siADN (Dbait) visant à sensibiliser les tumeurs aux radiothérapies en mimant des cassures double-brins d'ADN, résultant en l'inhibition de la réparation de l'ADN. Il a été montré que l'injection intra-péritonéale de 100 µg chloroquine à des souris, préalablement à l'administration des molécules thérapeutiques, potentialise l'effet de ces dernières sur des xénogreffes de mélanome (Berthault et al. 2011).

Des études récentes ont également décrit le couplage de molécules dérivées de la chloroquine à des CPP, utilisés pour augmenter l'internalisation cellulaire de siARN par une stratégie non covalente. Le peptide PepFect6 correspond à un peptide TP10 (AGYLLGKINLKALAALAKKIL, de 21 résidus avec quatre charges nettes) avec un groupement stéaryl et fonctionnalisé avec quatre molécules de trifluorométhylquinoline qui lui sont covalamment attachées. Cette modification augmente nettement l'efficacité de ce conjugué en induisant l'échappement endosomal des molécules (Andaloussi et al. 2011; Dash-Wagh et al. 2012). De même, le peptide PepFect15 est composé du CPP PepFect14, dont la séquence dérive de celle du peptide TP10 (avec des ornithines et des leucines à la place des lysines et isoleucines), est fonctionnalisé avec ces analogues de chloroquine (Lindberg et al. 2013). Beaucoup de recherches sont également investies dans le développement de CPP fusogènes, c'est-à-dire capables de perturber la membrane des endosomes à pH faible (Hatakeyama et al. 2009; Chen et al. 2010).

L'internalisation par le peptide (R/W)9 en présence de chloroquine, du PNA 13-mer dirigé contre l'IGF1R conduit à l'inhibition de l'expression d'IGF1R- β dans les cellules de cancer de la prostate, inhibant la signalisation associée au récepteur et le potentiel tumorigène des cellules. Des études supplémentaires devront être réalisées afin de déterminer si cet effet est dû à la simple inhibition de l'expression du récepteur, ou si une protéine tronquée dominant négatif est exprimée dans les cellules après arrêt de l'élongation de la traduction. La compréhension des mécanismes impliqués dans cette inhibition serait de grand intérêt pour le développement de cette stratégie qui pourrait être appliquée en théorie à tous les récepteurs cellulaires pour inhiber leur expression et neutraliser leur(s) ligand(s).

Le développement de CPP efficaces pour l'internalisation cellulaire des oligonucléotides neutres est également un enjeu pour l'utilisation des PMO, actuellement en développement clinique dans le traitement de la dystrophie musculaire de duchenne (Cirak et al. 2011). Des études précliniques rapportant l'efficacité de différents conjugués CPP-PMO sont prometteuses pour le développement clinique de ces molécules (Jearawiriyapaisarn et al. 2008). Il a été montré que les PNA sont également des bloqueurs stériques efficaces dans la stratégie de saut d'exon (Yin et al. 2008) et le développement de conjugués PNA-CPP pour la

correction de l'épissage fait l'objet de nombreuses études (Said Hassane et al. 2010; Wancewicz et al. 2010; Ivanova et al. 2008). Les PNA sont également des bloqueurs stériques efficaces de la fonction des miARN *in vivo* (Fabani et al. 2010).

La compréhension des interactions physico-chimiques et des mécanismes biologiques impliqués dans l'internalisation cellulaire des CPP est donc cruciale pour le développement de CPP comme transporteurs efficaces.

Matériel et Méthodes

I. Matériel

Oligonucléotides

Les oligonucléotides PNA et LNA utilisés sont synthétisés par Eurogentec ou Panagene. Les oligonucléotides PMO sont fournis par Gene Tools. Les lyophilisats sont repris dans de l'eau bidistillée à une concentration stock d'environ 200-500 μM et stockés à -20°C . Les concentrations des oligonucléotides sont calculées à partir de l'absorbance à 260 nm, mesurée sur un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

Nature	Nom	Séquence (5' vers 3')	Taille
PNA	AS2	TCCCCCCTTTTCT	13-mer
	AS1	CCCCTTTTCTTTT	13-mer
	scr1	TTCTCTCTCTCTT	13-mer
	scr2	TTTCCTCTCCCT	13-mer
	PNA18	TCCCCCCTTTTCTTTTAA	18-mer
LNA	LNA18	TCCCCCCTTTTCTTTTAA	18-mer
PMO	PMO18	TCCCCCCTTTTCTTTTAA	18-mer

Tableau 7 : Séquences des PNA dirigés contre la cible PPT.

Tous les PNA comportent une lysine en 3'.

Nature	Nom	Séquence (5' vers 3')	Taille
PNA	PNA959	TTATTTCTCTTTCTATG	17-mer
PO	PO 959	TTATTTCTCTTTCTATG	17-mer
PNA	N-16	TTATTTCTCTTTCTAT	16-mer
	N-15	TTATTTCTCTTTCTA	15-mer
	N-14	TTATTTCTCTTTCT	14-mer
	N-13	TTATTTCTCTTTC	13-mer
	C-16	TATTTCTCTTTCTATG	16-mer
	C-15	ATTTCTCTTTCTATG	15-mer
	C-14	TTTCTCTTTCTATG	14-mer
	C-13	TTCTCTTTCTATG	13-mer
	C1	TATTCTTGTTCTTATCT	17-mer
	scr1	TATGTTCTCTATT	13-mer
	scr2	TCTATTGTCTCTT	13-mer
	scr13	CTTGTTCTTATCT	13-mer

Tableau 8 : Séquences des PNA dirigés contre l'IGF1R.

Les PNA comportent deux lysines en 3'.

PNA	Séquence (5' vers 3')	Composition	Taille
C1	TATTCTTGTTCTTATCT	T11A2C3G1	17-mer
scr13	CTTGTTCTTATCT	T8A1C3G1	13-mer
scr1	TATGTTCTCTATT	T8A2C2G1	13-mer

Tableau 9 : Composition en bases des PNA contrôles (*scramble*) utilisés dans les études avec les PNA ciblant l'IGF1R.

Le PNA *scramble* C1 est un contrôle du PNA 959 (TTATTTCTCTTTCTATG, composition T11A2C3G1), les PNA scr13, scr1 et scr2 sont des contrôles du PNA C13 (TTCTCTTTCTATG, composition T8A1C3G1). Ces PNA comportent deux lysines en C-terminal.

Cell Penetrating Peptides (CPP) et conjugués CPP-PNA

La séquence et les caractéristiques des CPP utilisés dans ce travail sont indiquées dans le tableau suivant.

		Nombre de résidus	Nombre de charges
(R/W)9	RRWRRRWRR	9	6
(K/W)9	KKWWKKWKK	9	6

Tableau 10 : Séquences et caractéristiques peptidiques des CPP (R/W)9 et (K/W)9.

Ces peptides, conjugués en N-terminal des PNA AS1 ou AS2, ont été synthétisés par Panagene. La liaison entre le PNA et le CPP est de type pont disulfure (clivage en milieu réducteur), *via* deux cystéines activées (Figure 72). Les conjugués sont donc réalisés selon la structure suivante : (Cter)CPP(Nter)-Cys-S-S-Cys-(Nter)PNA(Cter).

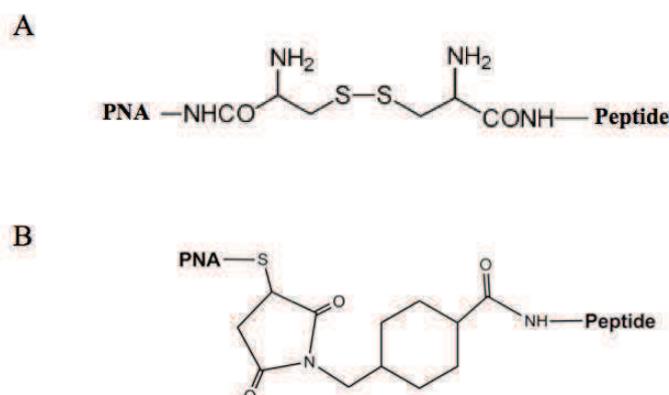


Figure 73 : Structure chimique de la liaison entre le PNA et le CPP.

A. liaison disulfure B. liaison thiol-maléimide

Alternativement, le CPP et le PNA sont reliés par une liaison thiol-maléimide (non clivable). Les conjugués désignés simplement par le nom du CPP suivi du nom du PNA correspondent aux conjugués comportant une liaison disulfide. Les conjugués comportant le PNA relié au CPP par liaison thiol-maléimide sont désignés (R/W)9-AS1(mal) et (R/W)9-AS2(mal).

Pour le suivi en microscopie et la quantification de l'internalisation cellulaire des conjugués, un fluorophore a été greffé sur le PNA, par l'intermédiaire d'une lysine en C-ter. Ce fluorophore correspond à la Tétraméthylrhodamine (TAMRA ; EX 555/EM 580 nm), ou au Texas Red (TR ; EX595/EM615 nm), donnant lieu aux conjugués (R/W)9-AS2-TAMRA et (R/W)9-AS2-TR, respectivement.

Cellules

Les différentes lignées cellulaires utilisées dans ce travail, ainsi que les milieux de culture correspondants, sont indiqués dans le Tableau 11. Toutes les lignées sont cultivées en atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO₂.

Lignée cellulaire	Origine	Espèce	Milieu de culture (Gibco, Life Technologies)	% SVF
HeLa 1002	Adénocarcinome de l'utérus	Humain	DMEM	7
DU145	Carcinome de la prostate, métastase de cerveau	Humain	RPMI	10
Jurkat	Lymphome de cellules T	Humain	RPMI	10
CHO K1	Cellules d'ovaires	hamster chinois	DMEM F12	10
CHO 745	Cellules d'ovaires	hamster chinois	DMEM F12	10
MCF7	Adénocarcinome du sein	Humain	DMEM	7
U2OS	Ostéosarcome osseux	Humain	McCoy's 5A	10

Tableau 11 : Caractéristiques et conditions de culture des lignées cellulaires utilisées dans ce travail.

La lignée cellulaire HeLa 1002 est dérivée des cellules HeLa/Tet-on (Clontech), qui expriment stablement le répresseur rTet (reverse Tet) nécessaire pour l'expression des promoteurs inductibles à la doxycycline. Ces cellules ont intégré stablement le plasmide pCMV(+)-PPT/luc, qui exprime les gènes rapporteurs luciférase *firefly* (*Photinus pyralis*) et *gfp* à partir d'un promoteur commun bidirectionnel CMV. Une séquence de 55 pb, contenant

la séquence PPT sauvage du gène de l'intégrase du VIH-1 (AAAGAAAAGGGGGGA), ou une séquence PPT mutée (AAAAGAAGGGGAGGAA), est insérée en 5'UTR des gènes rapporteurs de la luciférase (*luc*) et de la GFP (*gfp*), respectivement (Brunet et al. 2006).

II. Méthodes

Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée sur la séquence de l'intégrase synthétique, exprimée dans le plasmide pmRFP-IN (fourni par l'équipe du docteur P. Cherepanov) a été réalisée avec le kit '*QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis*' (Agilent Technologies). Le plasmide pmRFP-IN (5540 pb) code pour l'intégrase synthétique en fusion avec la RFP, exprimée à partir d'un promoteur CMV. La séquence PPT du gène de l'intégrase contenu dans ce plasmide a déjà été restaurée par cette même technique de mutagenèse (thèse de Sabine Lecosnier), à l'exception de la dernière cytosine, qui doit être mutée en guanine (Figure 42). La technique de mutagenèse utilisée dans ce kit, repose sur l'introduction de la mutation par PCR avec des amorces contenant la base modifiée et une polymérase de haute fidélité, suivie de la dégradation de l'ADN parental non muté par l'enzyme DpnI. Cette endonucléase cible la séquence 5'-Gm⁶ATC-3' et est donc spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé. Les plasmides issus de la plupart des souches de *E. coli* sont méthylés par la méthylase dam et sont donc sensibles à la dégradation par DpnI, c'est pourquoi l'ADN plasmidique parental (non muté) sera dégradé par cette enzyme. Le vecteur contenant la mutation après la PCR est ensuite introduit dans des bactéries ultracompetentes XL10-Gold.

Les amorces utilisées pour l'introduction de la mutation par PCR sont les suivantes : mut1 GCTGAGTAGCCACCGATCCCCCTTTTCTTTTGAAG (36 bases, T_m = 81,6°C) et mut2 CTTCAAAGAAAAGGGGGGATCGGTGGCTACTCAGC (36 bases, T_m = 81,6°C). La PCR est réalisée sur 10 µg d'ADN avec la polymérase Phusion (New England Biolabs) et un temps d'élongation de 30 s/kb de plasmide, soit 2,46 s.

L'efficacité de la mutagenèse est déterminée par séquençage de l'ADN plasmidique des clones sélectionnés après transformation des bactéries. Le séquençage est réalisé par la société GATC Biotech avec l'amorce INsynLEFT (ACACAGATAACGGCTCCA). Le gène muté de l'intégrase synthétique est ensuite sous-cloné dans le vecteur pVax digéré par les enzymes de restriction Acc65I et XbaI, à l'aide du kit '*In-Fusion® HD Cloning Kit*' (Clontech). Les amorces utilisées pour la PCR sont les suivantes : FWinfusINXhoI

(GCATCCACGGGGTACCCTCGAGCAGATTCCTGGAC ; 35 bases) et REVinfusINHindIII (AACGGGCCCTTCTAGAAGCTTGGACTTAGTCCTCATC ; 37 bases). Le vecteur pVax-INsyn (3954 pb) comporte une étiquette Flag en amont du gène de l'intégrase synthétique mutée. Cette étiquette Flag correspond à l'octapeptide DYKDDDDK (1012 Da) et permet une détection facilitée de la protéine. Dans ce plasmide, le gène de l'intégrase est exprimé à partir d'un promoteur d'expression eucaryote CMV ou d'un promoteur de bactériophage T7. Le codon d'initiation sauvage a disparu car le gène était en fusion avec la RFP. La traduction débute donc à partir du second AUG, donnant naissance à une protéine de 30 kDa au lieu de 32 kDa pour la protéine sauvage. La séquence du clone sélectionné après ce clonage est vérifiée par séquençage (GATC Biotech) avec l'amorce INsynLEFT.

Transcription in vitro

Les transcriptions *in vitro* sont réalisées à partir d'un vecteur plasmidique exprimant le gène à transcrire en aval d'un promoteur de bactériophage T7 ou SP6. Le plasmide est linéarisé en 3' du gène puis purifié par précipitation à l'éthanol. La transcription est ensuite réalisée avec le kit 'MEGAscript® High Yield Transcription' (Ambion), à partir d'1 µg d'ADN plasmidique linéarisé, en présence de l'ARN polymérase T7 ou SP6, des quatre ribonucléotides et de 20 unités de RNaseOUT™ (Life Technologies) pendant 2 heures (Intégrase) ou 4 heures (IGF1R). Les transcrits sont ensuite purifiés à l'aide du kit 'MEGAclear™' (Ambion), qui permet d'éliminer les ARN de taille inférieure à 100 nt, les ribonucléotides, la polymérase et les sels. La quantité d'ARN est ensuite évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm avec le spectrophotomètre Nanodrop.

Les plasmides utilisés pour la transcription sont les suivants :

- pRP159-IN linéarisé par NdeI (promoteur SP6)
- pcDNA3-IGF1R linéarisé par BamHI (promoteur SP6)
- pVax-INsyn linéarisé par HindIII (promoteur T7)

La taille des transcrits est d'environ 956 nt pour l'intégrase, et de 4100 nt pour l'IGF1R.

Traduction in vitro

Les transcrits sont ensuite incubés en présence des oligonucléotides dans un volume final de 8 μL et le mélange est préincubé 5 min à 37°C (pour IGF1R) ou non (intégrase). La traduction est réalisée dans un lysat de réticulocytes de lapin traité avec une nucléase de *Micrococcus* afin de détruire les ARNm endogènes et ainsi réduire le bruit de fond de la traduction au minimum (*Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated* de Promega). Ce lysat (contient tous les composants cellulaires nécessaire à la synthèse protéique (ARNt, ribosomes, acides aminés, facteurs de transcription). Aux 8 μL de complexe ARN/oligonucléotide sont ajoutés 17 μL de lysat de réticulocytes, 2 μL d'un mix d'acides aminés sans méthionine et 0,8 μL de méthionine ^{35}S (30 μCi , Perkin Elmer). Une unité de RNase H (Epicentre) est ajouté à ce mélange réactionnel dans le cas où l'oligonucléotide est un PO. Les concentrations en oligonucléotides indiqués sur les gels correspondent aux concentrations dans ce volume total de 27,8 μL . La traduction est réalisée pendant 20 min à 37°C . 8 μL sont ensuite déposés sur gel SDS-PAGE d'acrylamide 8% (IGF1R) ou 14% (intégrase), avec une migration à 12 mA. Le gel est ensuite fixé dans un bain 10% éthanol/10% acide acétique pendant 45 min puis rincé 3 fois 10 min dans de l'eau bidistillée. Le gel est ensuite transféré sur papier Whatman 3MM et séché et exposé sur un écran radiosensible pour révélation par autoradiographie au Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Immunoprécipitations in vitro de l'IGF1R

Pour les immunoprécipitations de la protéine IGF1R produite par traduction *in vitro*, le volume réactionnel à l'issue de l'incubation de 20 min 37°C est complété à 100 μL par ajout de 72,2 μL de tampon RIPA1X (Millipore), auxquels sont ajoutés 3 μg d'anticorps H60 anti-IGF1R (sc-9038, Santa Cruz Biotechnology), dirigé contre la partie N-terminale de la chaîne β . Cet anticorps peut donc à la fois reconnaître la protéine entière (150 kDa) et la protéine tronquée (109 kDa). Le mix est incubé pendant 1h sur glace, puis 10 μL de billes protéine A-agarose (sc-2001, Santa Cruz Biotechnology) préalablement lavées 2 fois avec 100 μL de tampon RIPA1X, sont ajoutées. Le mélange est incubé sur la nuit à 4°C sur roue d'agitation. Le lendemain, les billes de chaque échantillon sont rincées six fois en PBS (avec une centrifugation de 30 secondes à 1000 rpm à chaque rinçage), et reprises dans 15 μL de tampon de charge 2X (Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2X), Life Technologies). Les échantillons sont chauffés 3 min à 85°C et déposés sur gel SDS-PAGE 8%. La migration des

protéines s'effectue à 12 mA. Le gel est ensuite fixé, séché et révélé comme indiqué dans la section *traduction in vitro*.

Gels retard (EMSA)

Radiomarquage des ARN cible en 5' : 20 pmol d'ARN cible (séquences indiquées dans le Tableau 12) sont radiomarqués en présence de 10 pmol d'ATP γ - ^{32}P (Perkin Elmer) et de 10 unités de T4 Polynucléotide Kinase (New England Biolabs), pendant 30 min à 37°C. Les produits sont ensuite passés sur une mini colonne d'exclusion Bio-Spin 30 (Bio-Rad) pour éliminer l'enzyme et l'ATP γ - ^{32}P non incorporé.

Un mix de 100 nM d'ARN radiomarqués en 5' au ^{32}P et 50 nM d'ARN non marqué (IGF1R) ou 2 nM d'ARN radiomarqués en 5' au ^{32}P (PPT) sont incubés avec des concentrations croissantes en oligonucléotides dans un tampon Tris 50 mM pH 8 pendant 10 min à 25°C (PPT) ou à 37°C (IGF1R). Les échantillons sont déposés sur un gel natif de polyacrylamide 15% (polyacrylamide/bis-acrylamide = 19/1) et la migration est réalisée à 25°C et 5W. Le gel et le tampon de migration contiennent du TBE (100 mM Tris/90 mM Acide Borique/1 mM EDTA) à pH 8,3. Après migration, le gel est séché et révélé par autoradiographie sur un Typhoon 9410 (GE Healthcare). Les quantifications de l'ARN non complexé et la détermination des IC₅₀ sont réalisées avec le logiciel Image Quant.

Nom de l'ARN	Séquence	Taille
ARN 959	CAUAGAAAGAGAAUAA	17-mer
ARN PPT WT	UUAAAAGAAAAGGGGGGAU	19-mer
ARN PPT mut	AUAAAAGAAAAAGGAGGAU	19-mer

Tableau 12 : Séquence des ARN utilisés pour les expériences de gels retard.

Expériences de dénaturation/renaturation thermiques

Les complexes entre les différents PNA à 1 μM et l'ARN 959 à 1 μM sont formés dans un tampon composé de 100 mM de chlorure de potassium et 10 mM de cacodylate de sodium à pH7, dans un volume final de 550 μL . Les échantillons contrôles contiennent uniquement du tampon, ou uniquement l'ARN 959 à 1 μM dans le tampon. Ces mélanges sont introduits dans des cuvettes optiques en quartz, de trajet optique d'1 cm. Quelques gouttes d'huile minérale sont ajoutées sur l'échantillon afin d'éviter l'évaporation lors du chauffage. La cuvette contenant l'échantillon est ensuite chauffée à 95°C dans le spectrophotomètre Uvikon XL

(BioTek), puis refroidie jusqu'à 20°C (renaturation) et chauffée jusqu'à 95°C (dénaturation). La vitesse de refroidissement et de chauffage est de 0,2°C/min et les absorbances à 260 nm et 330 nm sont enregistrés chaque 1°C. L'acquisition des données est réalisée avec le logiciel LifePower *tm* (DuSoTec GmbH). L'analyse des données est effectuée sous Excel et les graphiques représentent l'absorbance corrigée (absorbance à 260 nm à laquelle est soustraite l'absorbance à 330 nm) en fonction de la température.

Amaxa DU145

Les PNA dirigés contre l'IGF1R- β sont introduits dans les cellules DU145 par nucléofection avec l'appareil Amaxa Nucleofector (Lonza). Les PNA sont préalablement chauffés 5 min à 65°C puis centrifugés 3 min à 13 000 rpm afin de culoter les éventuels agrégats. 200 000 ou 300 000 cellules DU145 sont électroporés avec le programme CM-137 en présence du PNA dans 20 μ L en tampon SE (Lonza) et dans des puits appropriés pour l'Amaxa (Lonza). Après 10 min à température ambiante, 80 μ L de milieu de culture chaud sont ajoutés aux cellules et celles-ci sontensemencées dans un puits de plaque 6 puits.

Pour l'établissement de la lignée stable exprimant IGF1R en fusion avec la Luciférase *Renilla reniformis* (R-Luc), 1 millions de cellules DU145 sont électroporées en cuvettes (Lonza) dans un tampon L (Lonza) en présence de 2 μ g de plasmide pIGF1R-RLuc, linéarisé par PvuI ou non. Ce plasmide nous a été fourni par le Dr. Tarik Issad (INSERM U567, UMR8104) et contient l'ADNc de l'IGF1R, dont l'extrémité C-terminale est en fusion avec la luciférase *Renilla reniformis* (RLuc). L'électroporation est réalisée avec le programme A-023, recommandé par Lonza pour les cellules DU145. Différentes dilutions de cellules sont ensuite transférées en boîtes de Pétri et cultivées en présence de Néomycine (G418, Sigma) à 300 ou 500 μ g/mL pour la sélection de clones ayant intégré stablement le plasmide. La mesure des signaux de la RLuc est réalisée avec le '*Renilla Luciferase Assay System*' (Promega).

Western Blot

Extraction et dosage des protéines :

Les protéines sont extraites dans un tampon RIPA 1X (Millipore) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete protease inhibitor cocktail, Roche) pendant 30 min dans la glace. Les échantillons sont ensuite centrifugés 15 min à 14 000 rpm pour culoter les débris cellulaires et les protéines sont dosées par la méthode colorimétrique BCA (Acide Bicinchronique) à l'aide du kit '*Pierce™ BCA Protein Assay*' (Thermo Scientific). Cette

technique repose sur la détection de la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^{1+} grâce à un réactif contenant du BCA. La mesure de l'absorbance à 562 nm est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon. Cette dernière est déterminée en se référant à une gamme étalon obtenue avec une protéine standard, la BSA (Bovine Serum Albumin ; gamme de 25 à 2000 $\mu\text{g/mL}$). Les mesures d'absorbances sont réalisées avec un spectrofluorimètre en plaque Wallac Victor² Multilabel Counter (Perkin Elmer).

Migration et transfert sur membrane :

30 à 50 μg de protéines sont déposées sur un gel SDS-PAGE 8% de polyacrylamide après chauffage 3 min à 85°C en présence de DTT et la migration est réalisée pendant 1h environ à 150V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose avec l'appareil de transfert Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). La qualité du transfert est contrôlée par une coloration de la membrane au rouge ponceau (0,5% rouge ponceau/1% acide acétique).

Hybridation et révélation :

La membrane est ensuite coupée afin de séparer la partie contenant la protéine de celle contenant l'actine. Les membranes sont saturées dans du lait 5% en tampon TBS (Euromedex) supplémenté de Tween 0,1% (Prolabo) (TBS-T) sur la nuit à 4°C ou pendant 1h à température ambiante. Après 3 rinçages de 10 min en TBS-T, les membranes sont incubées avec les anticorps primaires suivants :

- anticorps anti-Flag de souris (F3165, Sigma), utilisé à une dilution de 1 :2 000 en lait 3% pendant 2h à température ambiante.
- anticorps C-20 anti-IGF1R- β de lapin (sc-713, Santa Cruz Biotechnology), dirigé contre la partie C-terminale de la chaîne β d'IGF1R. Cet anticorps est utilisé à une dilution au 1 :200 dans du lait 1% sur la nuit à 4°C .
- anticorps anti- β actine de souris (A5316, Sigma), utilisé à une dilution de 1 :10 000 dans du lait 1% pendant 30-65 min à température ambiante.

Les membranes sont lavées 3 fois 10 min dans du TBS-T puis incubées 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires suivants, couplés à l'enzyme HRP (Horseradish Peroxydase) : anti-IgG de souris produit chez le mouton (NA9310V, GE Healthcare) au 1 :10 000 ou anti-IgG de lapin produit chez la chèvre (31460, Thermo Scientific) au 1 :5 000. Après rinçages des membranes, le signal est révélé par chimioluminescence avec les réactifs ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare). La détection du signal est réalisée avec un

appareil G:BOX (Ozyme). Les signaux correspondants à l'IGF1R- β et à l'actine sont quantifiés avec le logiciel ImageJ. Les valeurs obtenues pour IGF1R- β sont normalisées par celles de l'actine afin de corriger les variations de quantité de protéines déposées dans le gel, et sont exprimées en % par rapport au signal des cellules électroporées en absence d'oligonucléotide.

Tests d'activité biologique des PNA et conjugués PNA-CPP en pénétration libre

9 500 cellules HeLa 1002 sontensemencées en plaque 96 puits la veille du traitement. Après un lavage en PBS, les cellules sont traitées par les PNA ou conjugués PNA-CPP dilués dans de l'opti-MEM en présence ou non de 150 μ L de chloroquine (CQ, Sigma) ou de différentes concentrations de CaCl_2 (Merck), pendant 4h à 37°C. L'expression de la luciférase est induite par ajout de 150 μ L de milieu DMEM 7% SVF contenant 1 μ g/mL de doxycycline (Sigma) et les cellules sont cultivées pendant 24 heures supplémentaires (ou 43h pour le traitement en présence de CaCl_2), avant d'être lysées pour la mesure de l'activité de la luciférase *Photinus pyralis* et de la fluorescence de la GFP (voir paragraphe suivant).

Pour les mesure de viabilité et toxicité cellulaires, les cellules sont traitées de manière identique. La viabilité cellulaire est évaluée par un test colorimétrique, réalisé avec le kit 'CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay' (Promega), qui utilise le réactif MTS (sels de tétrazolium) pour former du formazan après réduction par la succinate déshydrogénase mitochondriale dans les cellules vivantes. La détection du formazan produit se fait par la mesure de l'absorbance à 490 nm à l'aide du spectrofluorimètre Wallac Victor² Multilabel Counter (Perkin Elmer). La toxicité cellulaire est déterminée sur les surnageants de culture des cellules traitées, avec le kit 'Cytotoxicity Detection Kit (LDH)' de Roche, qui utilise un test colorimétrique pour la mesure de l'activité des lactates déshydrogénases (LDH) relarguées dans le surnageant par les cellules endommagées. Les LDH catalysent la conversion du lactate en pyruvate, qui provoque la réduction du NAD^+ en $\text{NAH} + \text{H}^+$. L'ajout de sels de tétrazolium sur lesquels sont transférés 2 hydrogènes par diaphorase à partir du $\text{NAH} + \text{H}^+$ produit, permet la formation de formazan. Ce formazan est détecté par mesure de l'absorbance à 490 nm avec le Wallac Victor² Multilabel Counter (Perkin Elmer).

Perméabilisation transitoire des cellules avec la Streptolysine O (SLO)

Pour la perméabilisation des cellules HeLa 1002, les cellules sont trypsinées et lavées deux fois en HBSS (Gibco, Life Technologies). 260 000 cellules sont perméabilisées pendant 15 min à 37°C avec 30 à 60 ng de SLO (fournie par le Dr. S. Bakhdi), en présence des PNA ou conjugués. La perméabilisation est stoppée par ajout de DMEM + 7% SVF et les cellules sont incubées pendant 20 min à 37°C. La concentration en PNA ou conjugués est de 1 µM final. 30 000 cellules sont alors transférées en triplicats dans une plaque 96 puits et incubées pendant 1h à 37°C. L'expression des gènes rapporteurs est induite par ajout de doxycycline (Sigma) à 1 µg/mL et incubation des cellules pendant 24h à 37°C. La mesure de l'activité luciférase est décrite ci-dessous.

*Mesure de l'activité de la luciférase de *Photinus pyralis* et de la fluorescence de la GFP*

Les cellules HeLa 1002 perméabilisées par la SLO ou non perméabilisées, ayant été traitées avec les PNA ou conjugués PNA-CPP sont tout d'abord lavées au PBS puis lysées dans 60 µL de tampon de lyse '*Passive Lysis Buffer*' (Promega) pendant 30-90 min sous agitation. Pour la mesure des activités luciférase, 25 µL de lysat sont placés dans une plaque 96 puits en polystyrène (Corning) et l'ajout du substrat (Luciférase assay substrate E151A, Promega) est réalisé automatiquement par le spectrofluorimètre Wallac Victor² Multilabel Counter (Perkin Elmer). La réaction de bioluminescence catalysée par la luciférase est la conversion de la luciférine en oxyluciférine, qui produit de la lumière. La fluorescence de la GFP est également mesurée avec 15 µL de lysat et 80 µL d'eau bidistillée, dans les mêmes plaques blanches 96 puits. Les mesures de fluorescence et de bioluminescence sont réalisées avec le spectrofluorimètre Wallac Victor² Multilabel Counter (Perkin Elmer). Un dosage par la méthode de Bradford est également réalisé à partir de 10-15 µL de lysat, avec du réactif de Bradford (Bio-Rad) et par lecture des absorbances à 595 nm avec le spectrofluorimètre. L'activité luciférase et la fluorescence de la GFP sont normalisées par microgramme de protéines, et sont exprimées en % par rapport aux cellules non traitées.

Microscopie de fluorescence

Pour toutes les expériences de microscopie, les cellules ont été traitées dans des microchambres IBIDI (Biovalley). 40 000 cellules par puitsensemencées la veille de l'observation ont été traitées dans un volume final de 150 μ L d'opti-MEM en présence de conjugué marqué au Texas Red ou à la TAMRA, à la concentrations et durée indiquées. Avant l'observation des cellules vivantes au microscope, le milieu de culture est remplacé par de l'HBSS ou du DMEM sans rouge phénol (Gibco, Life Technologies). Dans certains cas, les noyaux des cellules ont été marqués avec du Hoechst 33342 (Molecular Probes, Life Technologies), incubé 30 min avant l'observation, à 200 ng/mL final. La viabilité cellulaire a été évaluée en marquant les cellules mortes par un colorant vital, le Sytoxgreen (Molecular Probes, Life Technologies), ajouté 30 min avant l'observation des cellules, à 0,5 μ M final.

Trois microscopes ont été utilisés pour nos observations :

- un microscope Leica DMIRE2 équipé avec une caméra Rooper Coolsnap CCD et une lampe Osram HXP R 120W 45C. La fluorescence est observée avec un filtre CY3 (EX BP 545/30, EM BP 610/75) et les acquisitions sont réalisées avec le logiciel Metamorph.
- un microscope Zeiss Axio Observer. Z1 équipé d'un système d'illumination structurée (ApoTome) permettant d'améliorer la résolution des images en éliminant la fluorescence des plans supérieurs et inférieurs de l'objet observé. Ceci est réalisé par un système de grilles qui oscillent selon trois positions différentes et génèrent trois images par acquisition. Un algorithme mathématique permet de générer une image définitive de haute résolution. Ce microscope est de plus équipé d'une chambre d'incubation à 37°C et 5% de CO₂ pour l'observation des cellules vivantes. Les acquisitions sont réalisées avec une caméra OrcaR2 (Hamamatsu) et un filtre DsRed (EX BP 550/25, EM BP 605/70) ou eGFP (EX BP 470/40, EM BP525/50). Le logiciel utilisé pour les acquisitions est AxioVision4.8.
- un microscope confocal Leica TCS-SP2.

Dans tous les cas, le traitement des images a été réalisé avec le logiciel ImageJ.

FACS

La fluorescence émise par le Texas Red dans les cellules traitées avec les PNA ou conjugués, a été quantifiée par cytométrie en flux avec le cytomètre C6 (Accuri) en utilisant le filtre FL3. Les cellules sont trypsinées pendant 10 min à 37°C et lavées deux fois au PBS. Seules les cellules vivantes sont sélectionnées selon les paramètres de taille (*Forward Scatter*) et de granulométrie (*Side Scatter*). Les moyennes de fluorescence mesurées ont été corrigées par

soustraction de la fluorescence mesurée dans les cellules non traitées, ou traitées avec le PNA AS1 ou AS2-TR, non conjugué au CPP.

Déplétion énergétique

Les cellules ensemencées la veille en microchambre IBIDI (40 000 cellules par puits) sont incubées avec le conjugué à 1 μM , pendant 1h à 37°C en présence de 10 mM d'azoture de sodium (Acros Organics) et de 6 mM de 2-déoxy-D-glucose (Sigma), ou pendant 1h à 4°C, puis observées au microscope ou analysées par cytométrie en flux.

Compétition pour l'héparine

Les cellules ensemencées la veille en microchambre IBIDI (40 000 cellules par puits) sont pré-traitées avec 5 $\mu\text{g/mL}$ d'héparine (heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa, Sigma) pendant 30 min à 37°C, puis incubées en présence de conjugué à 1 μM et d'héparine à 5 $\mu\text{g/mL}$ pendant 1h. La fluorescence est ensuite quantifiée par cytométrie en flux.

Traitement à la chloroquine

Les cellules ensemencées la veille en microchambre IBIDI (40 000 cellules par puits) sont traitées avec 1 μM de conjugué et 150 μM de chloroquine (Sigma) pendant 4h à 37°C puis analysées par cytométrie en flux ou microscopie de fluorescence. Pour l'analyse à 24h, du DMEM + 7% SVF est ajouté au milieu de traitement et les cellules sont cultivées pendant 20h supplémentaire à 37°C.

Recherche de colocalisation avec des marqueurs d'endocytose

Les cellules ensemencées la veille en microchambre IBIDI (40 000 cellules par puits), sont traitées avec le conjugué (R/W)9-AS2-TR à 1,5 μM et le marqueur fluorescent (voir ci-dessous) pendant 2h puis observées au microscope Zeiss Axio Observer Z1.

Les marqueurs utilisés proviennent de Molecular Probes et sont les suivants : Transferrine-Alexa 488 (25 $\mu\text{g/mL}$, marque la voie dépendante de la clathrine), Dextran-Alexa 488 (0,25 mg/mL, marque la macropinocytose), sous-unité B de la toxine du choléra-Alexa 488 (10 $\mu\text{g/mL}$, marque la voie dépendante de la cavéoline) et lysotracker green DND26-Alexa 488 (1 μM , marque les lysosomes).

PCI

Pour l'observation de la PCI au microscope, les expériences sont réalisées en microchambres IBIDI (Biovalley). 15 000 cellules HeLa 1002 par puits sontensemencées la veille du traitement dans un volume de 300 μL de milieu DMEM + 7% SVF. Les cellules sont traitées avec le conjugué (R/W)9-AS2-TAMRA ou (R/W)9-scr2-TAMRA pendant 4h à la concentration indiquée, dans un volume final de 150 μL d'opti-MEM. Les cellules sont ensuite cultivées pendant 24h dans du DMEM + 7% SVF avant d'être observées dans de l'HBSS avec le microscope LEICA DMIRE2. Le phénomène de PCI est observée lors de l'irradiation en continu des cellules avec le filtre CY3 (EX BP 545/30, EM BP 610/75) et les acquisitions en timelaps sont réalisées avec le logiciel Metamorph.

Les expériences de PCI pour l'étude de l'activité biologique sont réalisées en plaque 96 puits, avec 9 500 cellules/puitsensemencées la veille du traitement. Les cellules sont rincées au PBS avant d'être incubées pendant 4h à 37°C en présence du conjugué à la concentration indiquée (1,5/3/5 μM). Trois volumes de DMEM + 7% SVF sont ensuite ajoutés, et les cellules sont incubées à 37°C sur la nuit. Le lendemain, les cellules sont rincées et incubées pendant 2h dans du DMEM + 7% SVF pour le renouvellement des membranes (chasse des conjugués). Les cellules sont ensuite irradiées dans la plaque 96 puits dans de l'HBSS, avec une lampe à arc au xénon (Oriol Stanford CT) à 1 000 W et un filtre 545/50 nm (Balzers), à des durées et des intensités variables. Après l'irradiation, l'efficacité de la photolibération est évaluée par observation en microscopie de fluorescence, et l'HBSS est remplacé par du DMEM + 7% SVF contenant de la doxycycline à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La lecture de l'activité luciférase est réalisée 24h après l'induction de son expression. Pour les expériences en présence de phthalocyanine d'aluminium (AlPcS_{2a}, Frontier Scientific), les cellules ont été traitées pendant 4h en opti-MEM contenant 5 μM de AlPcS_{2a} et le conjugué à la concentration indiquée. Puis, trois volumes de milieu DMEM + 7%SVF contenant la même concentration de AlPcS_{2a} sont ajoutés et les cellules sont cultivées sur la nuit. La suite de l'expérience est identique aux expériences sans AlPcS_{2a}, mais avec une irradiation avec un filtre 650/50 nm (K65 de Balzers), à une intensité de 250 mW/cm^2 et pendant 9 min.

Bibliographie

- Aartsma-Rus, A. et al., 2004. Comparative analysis of antisense oligonucleotide analogs for targeted DMD exon 46 skipping in muscle cells. *Gene therapy*, 11(18), pp.1391–8.
- Aartsma-Rus, A. & van Ommen, G.-J.B., 2009. Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders. *European journal of human genetics : EJHG*, 18(2), pp.146–53.
- Abes, S. et al., 2007. Efficient splicing correction by PNA conjugation to an R6-Penetratin delivery peptide. *Nucleic acids research*, 35(13), pp.4495–502.
- Abes, S., Williams, D., et al., 2006. Endosome trapping limits the efficiency of splicing correction by PNA-oligolysine conjugates. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 110(3), pp.595–604.
- Abes, S., Moulton, H.M., et al., 2006. Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)₄ peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 116(3), pp.304–13.
- Akker, J.T. Van Den et al., 2011. Systemic Administration of PRO051 in Duchenne's Muscular Dystrophy. *the New England Journal of Medicine*, 364(16), pp.1513–1522.
- Alam, M.R. et al., 2008. Intracellular delivery of an anionic antisense oligonucleotide via receptor-mediated endocytosis. *Nucleic acids research*, 36(8), pp.2764–76.
- Allinquant, B. et al., 1995. Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *The Journal of cell biology*, 128(5), pp.919–27.
- Alves, I.D. et al., 2008. Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution. *Biochimica et biophysica acta*, 1780(7-8), pp.948–59.
- Amand, H.L. et al., 2012. Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans. *Biochimica et biophysica acta*, 1818(11), pp.2669–78.
- Amand, H.L. et al., 2008. Stimulated endocytosis in penetratin uptake: effect of arginine and lysine. *Biochemical and biophysical research communications*, 371(4), pp.621–5.
- Åmand, H.L., Nordén, B. & Fant, K., 2012. Functionalization with C-terminal cysteine enhances transfection efficiency of cell-penetrating peptides through dimer formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 418(3), pp.469–74.
- Andaloussi, S.E.L. et al., 2011. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic acids research*, 39(9), pp.3972–87.
- André, F. et al., 1999. Integrins and E-cadherin cooperate with IGF-I to induce migration of epithelial colonic cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 83(4), pp.497–505.

- Andrews, D.W. et al., 2001. Results of a pilot study involving the use of an antisense oligodeoxynucleotide directed against the insulin-like growth factor type I receptor in malignant astrocytomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(8), pp.2189–200.
- Arteaga, C.L. & Osborne, C.K., 1989. Growth inhibition of human breast cancer cells in vitro with an antibody against the type I somatomedin receptor. *Cancer research*, 49(22), pp.6237–41.
- Aubry, S. et al., 2009. Cell-surface thiols affect cell entry of disulfide-conjugated peptides. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(9), pp.2956–67.
- Aubry, S. et al., 2010. MALDI-TOF mass spectrometry: a powerful tool to study the internalization of cell-penetrating peptides. *Biochimica et biophysica acta*, 1798(12), pp.2182–9.
- Bagga, S. et al., 2005. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, 122(4), pp.553–63.
- Baker, B.F. et al., 1997. 2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified Anti-intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) Oligonucleotides Selectively Increase the ICAM-1 mRNA Level and Inhibit Formation of the ICAM-1 Translation Initiation Complex in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(18), pp.2510–2519.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), pp.281–97.
- Baserga, R., 2013. The decline and fall of the IGF-I receptor. *Journal of cellular physiology*, 228(4), pp.675–9.
- Basu, S. & Wickstrom, E., 1997. Synthesis and Characterization of a Peptide Nucleic Acid Conjugated to a D -Peptide Analog of Insulin-like Growth Factor 1. *Bioconjugate chemistry*, 1802(7), pp.481–488.
- Bechara, C. et al., 2013. Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(2), pp.738–49.
- Bechara, C. & Sagan, S., 2013. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS letters*, 587(12), pp.1693–702.
- Behlke, M. a, 2006. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 13(4), pp.644–70.
- Behm-Ansmant, I. et al., 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development*, 20(14), pp.1885–98.
- Belehradek, M. et al., 1993. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer*, 72(12), pp.3694–700.
- Belting, M., 2003. Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends in biochemical sciences*, 28(3), pp.145–51.

- Benjaminsen, R. V et al., 2013. The possible “proton sponge” effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(1), pp.149–57.
- Bennett, C.F. & Swayze, E.E., 2010. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, pp.259–93.
- Van den Berg, C.L. et al., 1997. Polyethylene glycol conjugated insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) inhibits growth of breast cancer in athymic mice. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 33(7), pp.1108–13.
- Berthault, N. et al., 2011. Comparison of distribution and activity of nanoparticles with short interfering DNA (Dbait) in various living systems. *Cancer gene therapy*, 18(10), pp.695–706.
- Bhattacharyya, S.N. et al., 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, 125(6), pp.1111–24.
- Bøe, S. & Hovig, E., 2006. Photochemically induced gene silencing using PNA-peptide conjugates. *Oligonucleotides*, 16(2), pp.145–57.
- Bøe, S.L., Longva, A.S. & Hovig, E., 2011. A novel photosensitizer for light-controlled gene silencing. *Nucleic acid therapeutics*, 21(5), pp.359–67.
- Boffa, L.C. et al., 2000. Dihydrotestosterone as a Selective Cellular/Nuclear Localization Vector for Anti-Gene Peptide Nucleic Acid in Prostatic Carcinoma Cells. *Cancer research*, 60, pp.2258–2262.
- Boudvillain, M. et al., 1997. Transplatin-modified oligo(2'-O-methyl ribonucleotide)s: a new tool for selective modulation of gene expression. *Biochemistry*, 36(10), pp.2925–31.
- Boussif, O. et al., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), pp.7297–301.
- Boutimah-Hamoudi, F. et al., 2007. Cellular antisense activity of peptide nucleic acid (PNAs) targeted to HIV-1 polypurine tract (PPT) containing RNA. *Nucleic acids research*, 35(12), pp.3907–17.
- Brito, J.L.R. et al., 2008. Streptolysin-O reversible permeabilisation is an effective method to transfect siRNAs into myeloma cells. *Journal of immunological methods*, 333(1-2), pp.147–55.
- Brunet, E. et al., 2006. Targeting chromosomal sites with locked nucleic acid-modified triplex-forming oligonucleotides : study of efficiency dependence on DNA nuclear environment. *Nucleic acids research*, 34(16), pp.4546–4553.
- Burfeind, P. et al., 1996. Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(14), pp.7263–8.
- Burnett, J.C. & Rossi, J.J., 2012. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chemistry & biology*, 19(1), pp.60–71.

- Camacho-Hübner, C. et al., 2002. Insulin-like growth factor (IGF)-I gene deletion. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 3(4), pp.357–61.
- Caplen, N.J. et al., 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), pp.9742–7.
- Caron, N.J., Quenneville, S.P. & Tremblay, J.P., 2004. Endosome disruption enhances the functional nuclear delivery of Tat-fusion proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 319(1), pp.12–20.
- Cesarone, G. et al., 2007. Insulin receptor substrate 1 knockdown in human MCF7 ER+ breast cancer cells by nuclease-resistant IRS1 siRNA conjugated to a disulfide-bridged D-peptide analogue of insulin-like growth factor 1. *Bioconjugate chemistry*, 18(6), pp.1831–40.
- Chen, S., Zhuo, R.-X. & Cheng, S.-X., 2010. Enhanced gene transfection with addition of a cell-penetrating peptide in substrate-mediated gene delivery. *The journal of gene medicine*, 12(8), pp.705–13.
- Chendrimada, T.P. et al., 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 447(7146), pp.823–8.
- Cherepanov, P. et al., 2000. High-level expression of active HIV-1 integrase from a synthetic gene in human cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(10), pp.1389–99.
- Cirak, S. et al., 2011. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet*, 378(9791), pp.595–605.
- De Clercq, E., Eckstein, F. & Merigan, T.C., 1969. Interferon Induction Increased through Chemical Modification of a Synthetic Polyribonucleotide. *Science*, 5(September), pp.18–20.
- Conner, S.D. & Schmid, S.L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), pp.37–44.
- Crombez, L. et al., 2009. A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(1), pp.95–103.
- Crooke, S.T., 1999. [I] Progress in Antisense Technology : The End of the Beginning Proof of Mechanism. *methods in enzymology*, 313(1991), pp.3–45.
- D'Ambrosio, C. et al., 1996. A soluble insulin-like growth factor I receptor that induces apoptosis of tumor cells in vivo and inhibits tumorigenesis. *Cancer research*, 56(17), pp.4013–20.
- Dash-Wagh, S. et al., 2012. Intracellular Delivery of Short Interfering RNA in Rat Organ of Corti Using a Cell-penetrating Peptide PepFect6. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 1, p.e61.
- Dassie, J.P. et al., 2009. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nature biotechnology*, 27(9), pp.839–49.

- Davis, M.E. et al., 2010. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*, 464(7291), pp.1067–70.
- Delaroché, D. et al., 2007. Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag. *Analytical chemistry*, 79(5), pp.1932–8.
- Deleavey, G.F. & Damha, M.J., 2012. Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. *Chemistry & biology*, 19(8), pp.937–54.
- Derossi, D. et al., 1996. Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), pp.18188–18193.
- Derossi, D. et al., 1994. The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes. *The Journal of biological chemistry*, 269(14), pp.10444–10450.
- Derossi, D., Chassaing, G. & Prochiantz, A., 1998. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends in cell biology*, 8(2), pp.84–7.
- Deshayes, S. et al., 2008. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. *Advanced drug delivery reviews*, 60(4-5), pp.537–47.
- Deshayes, S. et al., 2006. Formation of transmembrane ionic channels of primary amphipathic cell-penetrating peptides. Consequences on the mechanism of cell penetration. *Biochimica et biophysica acta*, 1758(11), pp.1846–51.
- Dias, N. et al., 2002. RNA hairpin invasion and ribosome elongation arrest by mixed base PNA oligomer. *Journal of molecular biology*, 320(3), pp.489–501.
- Dias, N. & Stein, C.A., 2002. Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. *Molecular cancer therapeutics*, 1, pp.347–355.
- Dikmen, Z.G. et al., 2005. In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: a novel human telomerase inhibitor. *Cancer research*, 65(17), pp.7866–73.
- Doyle, D.F. et al., 2001. Inhibition of gene expression inside cells by peptide nucleic acids: effect of mRNA target sequence, mismatched bases, and PNA length. *Biochemistry*, 40(1), pp.53–64.
- Drin, G. et al., 2001. Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide. Role of lipid-binding affinity. *European journal of biochemistry / FEBS*, 268(5), pp.1304–14.
- Duchardt, F. et al., 2007. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8(7), pp.848–66.
- Dunn, S.E. et al., 1998. A dominant negative mutant of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits the adhesion, invasion, and metastasis of breast cancer. *Cancer research*, 58(15), pp.3353–61.
- Durfort, T. et al., 2012. Small interfering RNA targeted to IGF-IR delays tumor growth and induces proinflammatory cytokines in a mouse breast cancer model. *PloS one*, 7(1), p.e29213.
- Egholm, M. et al., 1993. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, 365, pp.566–568.

- Ekman, S. et al., 2011. Clinical Phase I study with an Insulin-like Growth Factor-1 receptor inhibitor: experiences in patients with squamous non-small cell lung carcinoma. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 50(3), pp.441–7.
- El-Andaloussi, S. et al., 2007. Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *The Biochemical journal*, 407(2), pp.285–92.
- El-andaloussi, S. et al., 2006. Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *the journal of gene medicine*, 8, pp.1262–1273.
- El-Sayed, A. et al., 2008. Octaarginine- and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. *The Journal of biological chemistry*, 283(34), pp.23450–61.
- Elbashir, S.M. et al., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), pp.494–8.
- Ers, L. et al., 1998. Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-C-methyleneribonucleosides. *tetrahedron letters*, 39, pp.5401–5404.
- Eulalio, A. et al., 2007. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Molecular and cellular biology*, 27(11), pp.3970–81.
- Ezzat, K. et al., 2012. Scavenger receptor-mediated uptake of cell-penetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(3), pp.1172–80.
- Fabani, M.M. et al., 2010. Efficient inhibition of miR-155 function in vivo by peptide nucleic acids. *Nucleic acids research*, 38(13), pp.4466–75.
- Fabani, M.M. & Gait, M.J., 2008. miR-122 targeting with LNA/2'-O-methyl oligonucleotide mixmers, peptide nucleic acids (PNA), and PNA-peptide conjugates. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(2), pp.336–46.
- Farhood, H., Serbina, N. & Huang, L., 1995. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochimica et biophysica acta*, 1235, pp.289–295.
- Faria, M. et al., 2001. Phosphoramidate oligonucleotides as potent antisense molecules in cells and in vivo. *Nature biotechnology*, 19(1), pp.40–4.
- Fawell, S. et al., 1994. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(2), pp.664–8.
- Felgner, P.L. et al., 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), pp.7413–7.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. & Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics*, 9(2), pp.102–14.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), pp.806–11.

- Fischer, D. et al., 2003. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24(7), pp.1121–31.
- Fitch, C.D., 1989. Ferriprotoporphyrin IX: role in chloroquine susceptibility and resistance in malaria. *Progress in clinical and biological research*, 313, pp.45–52.
- Fluiter, K. et al., 2003. In vivo tumor growth inhibition and biodistribution studies of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 31(3), pp.953–962.
- Folini, M. et al., 2003. Photochemical Internalization of a Peptide Nucleic Acid Targeting the Catalytic Subunit of Human Telomerase. *Cancer research*, 63, pp.3490–3494.
- Frankel, A.D. & Pabo, C.O., 1988. Cellular Uptake of the Tat Protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell*, 55, pp.1189–1193.
- Frasca, F. et al., 1999. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Molecular and cellular biology*, 19(5), pp.3278–88.
- Fuchs, S.M. & Raines, R.T., 2004. Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry*, 43(9), pp.2438–44.
- Furukawa, J. et al., 2010. Antisense oligonucleotide targeting of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in prostate cancer. *The Prostate*, 70(2), pp.206–18.
- Gao, W.-Y. et al., 1991. Phosphorothioate Oligonucleotides Are Inhibitors of Human DNA Polymerases and RNase H: Implications for Antisense Technology. *molecular pharmacology*, 41, pp.223–229.
- García-Echeverría, C. et al., 2004. In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-1R kinase. *Cancer cell*, 5(3), pp.231–9.
- Gee, J.E. et al., 1998. Assessment of high-affinity hybridization, RNase H cleavage, and covalent linkage in translation arrest by antisense oligonucleotides. *Antisense & nucleic acid drug development*, 8(2), pp.103–11.
- Gehl, J., 2003. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta physiologica Scandinavica*, 177(4), pp.437–47.
- Gillmeister, M.P., Betenbaugh, M.J. & Fishman, P.S., 2011. Cellular trafficking and photochemical internalization of cell penetrating peptide linked cargo proteins: a dual fluorescent labeling study. *Bioconjugate chemistry*, 22(4), pp.556–66.
- Gooding, M. et al., 2012. siRNA delivery: from lipids to cell-penetrating peptides and their mimics. *Chemical biology & drug design*, 80(6), pp.787–809.
- Goya, M. et al., 2004. Growth inhibition of human prostate cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice by a ligand-specific antibody to human insulin-like growth factors. *Cancer research*, 64(17), pp.6252–8.
- Gryaznov, S. et al., 1996. Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as antisense agents. *Nucleic acids research*, 24(8), pp.1508–14.

- Gryaznov, S.M. et al., 1995. Oligonucleotide N3' -> P5' phosphoramidates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(June), pp.5798–5802.
- Guvakova, M.A. et al., 1995. Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides Bind to Basic Fibroblast Growth Factor, Inhibit Its Binding to Cell Surface Receptors, and Remove It from Low Affinity Binding Sites on Extracellular Matrix. *The Journal of biological chemistry*, 270(6), pp.2620–2627.
- Häcker, U., Nybakken, K. & Perrimon, N., 2005. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(7), pp.530–41.
- Hamilton, S.E. et al., 1999. Cellular delivery of peptide nucleic acids and inhibition of human telomerase. *Chemistry & biology*, 6(6), pp.343–51.
- Hammond, S.M. et al., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775), pp.293–6.
- Hammond, S.M. et al., 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), pp.1146–50.
- Hankinson, S.E. et al., 1998. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet*, 351(9113), pp.1393–6.
- Hansen, G.I. et al., 2001. Structural isomers of bis-PNA bound to a target in duplex DNA. *Journal of molecular biology*, 307(1), pp.67–74.
- Hanvey, J.C. et al., 1992. Antisense and Antigene Properties of Peptide Nucleic Acids. *science*, 258, pp.1481–1485.
- Hartog, H. et al., 2007. The insulin-like growth factor 1 receptor in cancer: old focus, new future. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 43(13), pp.1895–904.
- Hatakeyama, H. et al., 2009. A pH-sensitive fusogenic peptide facilitates endosomal escape and greatly enhances the gene silencing of siRNA-containing nanoparticles in vitro and in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 139(2), pp.127–32.
- Heidegger, I. et al., 2011. Targeting the insulin-like growth factor network in cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 11(8), pp.701–707.
- Hellawell, G.O. et al., 2002. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer research*, 62(10), pp.2942–50.
- Herce, H.D. et al., 2009. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophysical journal*, 97(7), pp.1917–25.
- Høgset, A., 2004. Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(1), pp.95–115.
- Hornung, V. et al., 2005. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nature medicine*, 11(3), pp.263–70.

- Hu, J. & Corey, D.R., 2008. Inhibiting Gene Expression with Peptide Nucleic Acid (PNA)-Peptide Conjugates that Target Chromosomal DNA. *Biochemistry*, 46(25), pp.7581–7589.
- Hua, Y. et al., 2008. Antisense Masking of an hnRNP A1 / A2 Intronic Splicing Silencer Corrects SMN2 Splicing in Transgenic Mice. *The American Journal of Human Genetics*, 82(April), pp.834–848.
- Humphreys, D.T. et al., 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), pp.16961–6.
- Idone, V. et al., 2008. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *The Journal of cell biology*, 180(5), pp.905–14.
- Ivanova, G.D. et al., 2008. Improved cell-penetrating peptide – PNA conjugates for splicing redirection in HeLa cells and exon skipping in mdx mouse muscle. *Nucleic acids research*, 36(20), pp.6418–6428.
- Jackson, A.L. et al., 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature biotechnology*, 21(6), pp.635–7.
- Jackson, J.G. et al., 2001. Regulation of breast cancer cell motility by insulin receptor substrate-2 (IRS-2) in metastatic variants of human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 20(50), pp.7318–25.
- Jackson, S.R. et al., 2007. Antiadhesive effects of GRN163L--an oligonucleotide N3'→P5' thio-phosphoramidate targeting telomerase. *Cancer research*, 67(3), pp.1121–9.
- Jearawiriyapaisarn, N. et al., 2008. Sustained dystrophin expression induced by peptide-conjugated morpholino oligomers in the muscles of mdx mice. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(9), pp.1624–9.
- Ji, J. et al., 2000. Synthesis and application of submicrometer fluorescence sensing particles for lysosomal pH measurements in murine macrophages. *Analytical chemistry*, 72(15), pp.3497–503.
- Jiang, T. et al., 2004. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *PNAS*, 101(51), pp.17867–17872.
- Jiang, Y. et al., 1999. Induction of tumor suppression and glandular differentiation of A549 lung carcinoma cells by dominant-negative IGF-I receptor. *Oncogene*, 18(44), pp.6071–7.
- Jiao, C.-Y. et al., 2009. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *The Journal of biological chemistry*, 284(49), pp.33957–65.
- Joergensen, M. et al., 2011. Efficiency of cellular delivery of antisense peptide nucleic acid by electroporation depends on charge and electroporation geometry. *Oligonucleotides*, 21(1), pp.29–37.
- Johansson, H.E. et al., 1994. Target-specific arrest of mRNA translation by antisense 2'-O-alkyloligoribonucleotides. *Nucleic acids research*, 22(22), pp.4591–8.
- Joliot, A. et al., 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), pp.1864–8.

- Judge, A.D. et al., 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nature biotechnology*, 23(4), pp.457–62.
- Juliano, R. et al., 2009. Biological Barriers to Therapy with Antisense and siRNA Oligonucleotides. *molecular pharmacology*, 6(3), pp.686–695.
- Juliano, R. et al., 2008. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic acids research*, 36(12), pp.4158–71.
- Juliano, R.L., Ming, X. & Nakagawa, O., 2011. Cellular uptake and intracellular trafficking of antisense and siRNA oligonucleotides. *Bioconjugate chemistry*, 23(2), pp.147–57.
- Kaleko, M., Rutter, W.J. & Miller, A.D., 1990. Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. *Molecular and cellular biology*, 10(2), pp.464–73.
- Kang, S.H., Cho, M.J. & Kole, R., 1998. Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry*, 37(18), pp.6235–9.
- Khalil, I.A. et al., 2006. Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery. *pharmacological reviews*, 58(1), pp.32–45.
- Khatib, A.M. et al., 2001. Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: importance of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor processing in IGF-1-mediated functions. *The Journal of biological chemistry*, 276(33), pp.30686–93.
- Knudsen, H. & Nielsen, P.E., 1996. Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic acids research*, 24(3), pp.494–500.
- Kole, R., Krainer, A.R. & Altman, S., 2012. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature reviews. Drug discovery*, 11(2), pp.125–40.
- Koller, E. et al., 2011. Mechanisms of single-stranded phosphorothioate modified antisense oligonucleotide accumulation in hepatocytes. *Nucleic acids research*, 39(11), pp.4795–807.
- Koppelhus, U. & Nielsen, P.E., 2003. Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA). *Advanced drug delivery reviews*, 55(2), pp.267–80.
- Koren, E. et al., 2012. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 160(2), pp.264–73.
- Koren, E. & Torchilin, V.P., 2012. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends in molecular medicine*, 18(7), pp.385–93.
- Koshkin, A.A., Rajwanshi, V.K. & Wengel, J., 1998. Novel Convenient Syntheses of LNA [2.2.1] Bicyclo Nucleosides. *tetrahedron letters*, 39, pp.8–11.
- Kozak, M., 1989. Circumstances and Mechanisms of Inhibition of Translation by Secondary Structure in Eucaryotic mRNAs. *Molecular and cellular biology*, 9(11), pp.5134–5142.

- Krützfeldt, J. et al., 2005. Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs”. *Nature*, 438(7068), pp.685–9.
- Kulkarni, A. et al., 2012. Pendant polymer:amino- β -cyclodextrin:siRNA guest:host nanoparticles as efficient vectors for gene silencing. *Journal of the American Chemical Society*, 134(18), pp.7596–9.
- Kull, F.C. et al., 1983. Monoclonal antibodies to receptors for insulin and somatomedin-C. *The Journal of biological chemistry*, 258(10), pp.6561–6.
- Kurreck, J., 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *European Journal of Biochemistry*, 270(8), pp.1628–1644.
- Kurreck, J. et al., 2002. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic acids research*, 30(9), pp.1911–8.
- Lam, W.L. and J.K.W., 2012. *Molecular Regulation of Endocytosis* B. Ceresa, ed., InTech.
- Landry, Y. & Gies, J.-P., 2008. Drugs and their molecular targets: an updated overview. *Fundamental & clinical pharmacology*, 22(1), pp.1–18.
- Lanford, R.E. et al., 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*, 327(5962), pp.198–201.
- Larsen, H.J., Bentin, T. & Nielsen, P.E., 1999. Antisense properties of peptide nucleic acid. *Biochimica et biophysica acta*, 1489(1), pp.159–66.
- Laufer, S.D. & Restle, T., 2008. Peptide-mediated cellular delivery of oligonucleotide-based therapeutics in vitro: quantitative evaluation of overall efficacy employing easy to handle reporter systems. *Current pharmaceutical design*, 14(34), pp.3637–55.
- Lebleu, B. et al., 2008. Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides. *Advanced drug delivery reviews*, 60(4-5), pp.517–29.
- Lecosnier, S. et al., 2011. A steric blocker of translation elongation inhibits IGF-1R expression and cell transformation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(7), pp.2201–10.
- Lee, C.-T. et al., 2003. Recombinant adenoviruses expressing dominant negative insulin-like growth factor-I receptor demonstrate antitumor effects on lung cancer. *Cancer gene therapy*, 10(1), pp.57–63.
- Leonetti, J.P. et al., 1991. Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(7), pp.2702–6.
- Li, S.-D. & Huang, L., 2010. Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 145(3), pp.178–81.
- Liebhaber, S.A., Cash, F. & Eshleman, S.S., 1992. Translation inhibition by an mRNA coding region secondary structure is determined by its proximity to the AUG initiation codon. *Journal of molecular biology*, 226(3), pp.609–21.

- Lima, W.F. et al., 2012. Single-stranded siRNAs activate RNAi in animals. *Cell*, 150(5), pp.883–94.
- Lindberg, S. et al., 2013. PepFect15, a novel endosomolytic cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery via scavenger receptors. *International journal of pharmaceuticals*, 441(1-2), pp.242–7.
- Linder, S., Shoshan, M.C. & Gupta, R.S., 2007. Picropodophyllotoxin or podophyllotoxin does not induce cell death via insulin-like growth factor-I receptor. *Cancer research*, 67(6), p.2899; author reply 2899–900.
- Liu, B. et al., 2002. Toward synthetic transcription activators: recruitment of transcription factors to DNA by a PNA-peptide chimera. *Journal of the American Chemical Society*, 124(9), pp.1838–9.
- Liu, J. et al., 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology*, 7(7), pp.719–23.
- Liu, J.P. et al., 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75(1), pp.59–72.
- Lyonnais, S. et al., 2002. G-quartets assembly within a G-rich DNA flap. A possible event at the center of the HIV-1 genome. *Nucleic acids research*, 30(23), pp.5276–83.
- Lyonnais, S. et al., 2003. G-quartets direct assembly of HIV-1 nucleocapsid protein along single-stranded DNA. *Nucleic acids research*, 31(19), pp.5754–63.
- Maile, L.A. et al., 2002. Insulin-like growth factor I increases alpha Vbeta 3 affinity by increasing the amount of integrin-associated protein that is associated with non-raft domains of the cellular membrane. *The Journal of biological chemistry*, 277(3), pp.1800–5.
- Mangos, M.M. et al., 2003. Efficient RNase H-directed cleavage of RNA promoted by antisense DNA or 2'F-ANA constructs containing acyclic nucleotide inserts. *Journal of the American Chemical Society*, 125(3), pp.654–61.
- Marlin, F. et al., 2010. Delivery of oligonucleotides and analogues: the oligonucleotide conjugate-based approach. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 11(11), pp.1493–500.
- Marlin, F. et al., 2012. Flavin conjugates for delivery of peptide nucleic acids. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 13(17), pp.2593–8.
- McNeer, N. a et al., 2011. Nanoparticles deliver triplex-forming PNAs for site-specific genomic recombination in CD34+ human hematopoietic progenitors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 19(1), pp.172–80.
- McNeer, N. a et al., 2013. Systemic delivery of triplex-forming PNA and donor DNA by nanoparticles mediates site-specific genome editing of human hematopoietic cells in vivo. *Gene therapy*, 20(6), pp.658–69.
- Melchior, F. & Gerace, L., 1995. Mechanisms of nuclear protein import. *Current opinion in cell biology*, 7(3), pp.310–8.
- Menu, E. et al., 2006. Inhibiting the IGF-1 receptor tyrosine kinase with the cyclolignan PPP: an in vitro and in vivo study in the 5T33MM mouse model. *Blood*, 107(2), pp.655–60.

- Mercatante, D.R. et al., 2001. Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death. *The Journal of biological chemistry*, 276(19), pp.16411–7.
- Mergny, J.-L. & Lacroix, L., 2003. Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides*, 13(6), pp.515–37.
- Milletti, F., 2012. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug discovery today*, 17(15-16), pp.850–60.
- Min, Y. et al., 2003. Genetic blockade of the insulin-like growth factor-I receptor: a promising strategy for human pancreatic cancer. *Cancer research*, 63(19), pp.6432–41.
- Min, Y. et al., 2005. Insulin-like growth factor I receptor blockade enhances chemotherapy and radiation responses and inhibits tumour growth in human gastric cancer xenografts. *Gut*, 54(5), pp.591–600.
- Mitchell, D.J. et al., 2000. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*, 56(5), pp.318–25.
- Mitsiades, C.S. et al., 2004. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer cell*, 5(3), pp.221–30.
- Morrione, A. et al., 1997. Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), pp.3777–82.
- Morris, M.C. et al., 1997. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic acids research*, 25(14), pp.2730–2736.
- Morris, M.C. et al., 2001. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature biotechnology*, 19(December), pp.1173–1176.
- Morris, M.C. et al., 2004. Combination of a new generation of PNAs with a peptide-based carrier enables efficient targeting of cell cycle progression. *Gene therapy*, 11(9), pp.757–64.
- Mueller, J. et al., 2008. Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines. *Bioconjugate chemistry*, 19(12), pp.2363–74.
- Nasevicius, a & Ekker, S.C., 2000. Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nature genetics*, 26(2), pp.216–20.
- Nielsen, P.E., 2010. Peptide nucleic acids (PNA) in chemical biology and drug discovery. *Chemistry & biodiversity*, 7(4), pp.786–804.
- Nielsen, P.E. et al., 1991. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *rayScience (New York, N.Y.)*, 254(5037), pp.1497–500.
- Nishina, K. et al., 2008. Efficient In Vivo Delivery of siRNA to the Liver by Conjugation of α - Tocopherol. *The American Society of Gene Therapy*, 16(4), pp.734–740.

- Norum, O.-J. et al., 2009. Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: from bench towards bedside medicine. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 96(2), pp.83–92.
- Nulf, C.J. & Corey, D., 2004. Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs). *Nucleic acids research*, 32(13), pp.3792–8.
- Obad, S. et al., 2011. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nature genetics*, 43(4), pp.371–8.
- Oehlke, J. et al., 1998. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochimica et biophysica acta*, 1414(1-2), pp.127–39.
- Oh, Y., 1998. IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding proteins. *Breast cancer research and treatment*, 47(3), pp.283–93.
- Oliveira, S. et al., 2007. Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(5), pp.1211–7.
- Olsen, P.H. & Ambros, V., 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental biology*, 216(2), pp.671–80.
- Omid, Y. et al., 2003. Toxicogenomics of non-viral vectors for gene therapy: a microarray study of lipofectin- and oligofectamine-induced gene expression changes in human epithelial cells. *Journal of drug targeting*, 11(6), pp.311–23.
- Oussedik, K. et al., 2010. Sequence-specific targeting of IGF-I and IGF-IR genes by camptothecins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(7), pp.2235–44.
- Palmer, M. et al., 1998. Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: the early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually during oligomerization. *The EMBO journal*, 17(6), pp.1598–605.
- Pappo, A.S. et al., 2011. R1507, a monoclonal antibody to the insulin-like growth factor 1 receptor, in patients with recurrent or refractory Ewing sarcoma family of tumors: results of a phase II Sarcoma Alliance for Research through Collaboration study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(34), pp.4541–7.
- Parton, R.G. & Howes, M.T., 2010. Revisiting caveolin trafficking: the end of the caveosome. *The Journal of cell biology*, 191(3), pp.439–441.
- Petersen, C.P. et al., 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular cell*, 21(4), pp.533–42.
- Peyrat, J.P. et al., 1993. Plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations in human breast cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 29A(4), pp.492–7.
- Pillai, R.S. et al., 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5740), pp.1573–6.

- Pollak, M., 2008. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature reviews. Cancer*, 8(12), pp.915–28.
- Pooga, Margus et al., 1998. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nature biotechnology*, 16, pp.857–861.
- Pooga, M et al., 1998. Cell penetration by transportan. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(1), pp.67–77.
- Powell-Braxton, L. et al., 1993. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes & development*, 7(12B), pp.2609–17.
- Prager, D. et al., 1994. Dominant negative inhibition of tumorigenesis in vivo by human insulin-like growth factor I receptor mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), pp.2181–5.
- Prager, D. et al., 1992. Human insulin-like growth factor I receptor function in pituitary cells is suppressed by a dominant negative mutant. *The Journal of clinical investigation*, 90(5), pp.2117–22.
- Rana, T.M., 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(1), pp.23–36.
- Ray, a & Nordén, B., 2000. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(9), pp.1041–60.
- Reinmuth, N. et al., 2002. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8(10), pp.3259–69.
- Reiss, K. et al., 1998. Inhibition of tumor growth by a dominant negative mutant of the insulin-like growth factor I receptor with a bystander effect. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 4(11), pp.2647–55.
- Resnik, J.L. et al., 1998. Elevated insulin-like growth factor I receptor autophosphorylation and kinase activity in human breast cancer. *Cancer research*, 58(6), pp.1159–64.
- Richard, J.P. et al., 2003. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *The Journal of biological chemistry*, 278(1), pp.585–90.
- Riedemann, J. et al., 2007. The EGF receptor interacts with the type 1 IGF receptor and regulates its stability. *Biochemical and biophysical research communications*, 355(3), pp.707–14.
- Roberts, R.W. & Crothers, D.M., 1996. Prediction of the stability of DNA triplexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), pp.4320–5.
- Rochester, M. a et al., 2005. Silencing of the IGF1R gene enhances sensitivity to DNA-damaging agents in both PTEN wild-type and mutant human prostate cancer. *Cancer gene therapy*, 12(1), pp.90–100.

- Rockwell, P. et al., 1997. Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp.6523–8.
- Rothbard, J.B. et al., 2004. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *Journal of the American Chemical Society*, 126(31), pp.9506–7.
- Rother, K.I. & Accili, D., 2000. Role of insulin receptors and IGF receptors in growth and development. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 14(7), pp.558–61.
- Rydström, A. et al., 2011. Direct translocation as major cellular uptake for CADY self-assembling peptide-based nanoparticles. *PloS one*, 6(10), p.e25924.
- Sachdev, D. et al., 2004. A dominant negative type I insulin-like growth factor receptor inhibits metastasis of human cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 279(6), pp.5017–24.
- Sachdev, D. & Yee, D., 2007. Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. *Molecular cancer therapeutics*, 6(1), pp.1–12.
- Said Hassane, F. et al., 2010. Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(5), pp.715–26.
- Saito, G., Swanson, J.A. & Lee, K.-D., 2003. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Advanced drug delivery reviews*, 55(2), pp.199–215.
- Sakai, N. & Matile, S., 2003. Anion-mediated transfer of polyarginine across liquid and bilayer membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 125(47), pp.14348–56.
- Saleh, A.F. et al., 2010. Synthesis and splice-redirecting activity of branched, arginine-rich peptide dendrimer conjugates of peptide nucleic acid oligonucleotides. *Bioconjugate chemistry*, 21(10), pp.1902–11.
- Samani, A.A. et al., 2004. Loss of tumorigenicity and metastatic potential in carcinoma cells expressing the extracellular domain of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cancer research*, 64(10), pp.3380–5.
- Sato, Y. et al., 2008. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nature biotechnology*, 26(4), pp.431–42.
- Schillaci, R. et al., 2006. Immunization with murine breast cancer cells treated with antisense oligodeoxynucleotides to type I insulin-like growth factor receptor induced an antitumoral effect mediated by a CD8+ response involving Fas/Fas ligand cytotoxic pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(6), pp.3426–37.
- Schwarz, D.S. et al., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2), pp.199–208.
- Schwarze, S.R. et al., 1999. In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science*, 285(5433), pp.1569–1572.

- Sebbage, V., 2009. Cell-penetrating peptides and their therapeutic applications. *Bioscience Horizons*, 2(1), pp.64–72.
- Seccareccia, E. & Brodt, P., 2012. The role of the insulin-like growth factor-I receptor in malignancy: an update. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, 22(6), pp.193–9.
- Selbo, P.K. et al., 2010. Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 148(1), pp.2–12.
- Sell, C. et al., 1993. Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), pp.11217–21.
- Sen, G.L. & Blau, H.M., 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature cell biology*, 7(6), pp.633–6.
- Sénameaud-Beaufort, C., Leforestier, E. & Saison-behmoaras, T.E., 2003. Short Pyrimidine Stretches Containing Mixed Base Elongation Arrest and Truncated Protein Synthesis. *Oligonucleotides*, 13(6), pp.465–478.
- Shammas, M. a et al., 1999. Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses “immortality” of transformed human cells. *Oncogene*, 18(46), pp.6191–200.
- Shiraishi, T. & Nielsen, P.E., 2006a. Enhanced delivery of cell-penetrating peptide-peptide nucleic acid conjugates by endosomal disruption. *Nature protocols*, 1(2), pp.633–6.
- Shiraishi, T. & Nielsen, P.E., 2012. Nanomolar cellular antisense activity of peptide nucleic acid (PNA) cholic acid (“umbrella”) and cholesterol conjugates delivered by cationic lipids. *Bioconjugate chemistry*, 23(2), pp.196–202.
- Shiraishi, T. & Nielsen, P.E., 2006b. Photochemically enhanced cellular delivery of cell penetrating peptide-PNA conjugates. *FEBS letters*, 580(5), pp.1451–6.
- Shiraishi, T., Pankratova, S. & Nielsen, P.E., 2005. Calcium ions effectively enhance the effect of antisense peptide nucleic acids conjugated to cationic tat and oligoarginine peptides. *Chemistry & biology*, 12(8), pp.923–9.
- Simões, S. et al., 1999. Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides. *Gene therapy*, 6(11), pp.1798–807.
- Simon, P. et al., 2008. Targeting DNA with triplex-forming oligonucleotides to modify gene sequence. *Biochimie*, 90(8), pp.1109–16.
- Skorski, T. et al., 1997. Antileukemia effect of c-myc N3'-->P5' phosphoramidate antisense oligonucleotides in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), pp.3966–71.
- Soutschek, J. et al., 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432(7014), pp.173–8.

- Stein, C. a et al., 2010. Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic acids research*, 38(1), p.e3.
- Stein, C.A. et al., 2008. *Therapeutic Oligonucleotides*, The Royal Society of Chemistry.
- Stein, H. & Hausen, P., 1969. Enzyme from Calf Thymus Degrading the RNA Moiety of DNA-RNA Hybrids: Effects on DNA-Dependent RNA Polymerase. *Science*, 166(Gb 6944), pp.393–395.
- Stephenson, M.L. & Zamecnik, P.C., 1978. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Biochemistry*, 75(1), pp.285–8.
- Stewart, D.A. et al., 2001. Psoralen-modified clamp-forming antisense oligonucleotides reduce cellular c-Myc protein expression and B16-F0 proliferation. *Nucleic acids research*, 29(19), pp.4052–61.
- Summerton, J. & Weller, D., 1997. Review Article Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties. *antisense and nucleic acid drug development*, 195(7), pp.187–195.
- Suzuki, T. et al., 2002. Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *The Journal of biological chemistry*, 277(4), pp.2437–43.
- Svasti, S. et al., 2009. RNA repair restores hemoglobin expression in IVS2-654 thalassemic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), pp.1205–10.
- Takyar, S., Hickerson, R.P. & Noller, H.F., 2005. mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell*, 120(1), pp.49–58.
- Taylor, R.W. et al., 1997. Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids. *Nature genetics*, pp.212–215.
- Théodore, L. et al., 1995. Intraneuronal Delivery of Protein Kinase C Pseudosubstrate Leads to Growth Cone Collapse. *the Journal of Neuroscience*, 15(11), pp.7158–7167.
- Thorén, P.E. et al., 2003. Uptake of analogs of penetratin, Tat(48–60) and oligoarginine in live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(1), pp.100–107.
- Thorén, P.E.G. et al., 2004. Membrane Binding and Translocation of Cell-Penetrating Peptides. *Biochemistry*, 43(12), pp.3471–89.
- Tognon, C.E. & Sorensen, P.H.B., 2012. Targeting the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) signaling pathway for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(1), pp.33–48.
- Torres, A.G. et al., 2011. Chemical structure requirements and cellular targeting of microRNA-122 by peptide nucleic acids anti-miRs. *Nucleic acids research*, 40(5), pp.2152–67.
- Torres, A.G. & Gait, M.J., 2012. Exploiting cell surface thiols to enhance cellular uptake. *Trends in biotechnology*, 30(4), pp.185–90.
- Turner, J.J. et al., 2005. Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucleic acids research*, 33(21), pp.6837–49.

- Turner, J.J. et al., 2007. MALDI-TOF mass spectral analysis of siRNA degradation in serum confirms an RNase A-like activity. *Molecular bioSystems*, 3(1), pp.43–50.
- Tyagi, M. et al., 2001. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of biological chemistry*, 276(5), pp.3254–61.
- ur Rehman, Z., Hoekstra, D. & Zuhorn, I.S., 2013. Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis. *ACS nano*, 7(5), pp.3767–77.
- ur Rehman, Z., Hoekstra, D. & Zuhorn, I.S., 2011. Protein kinase A inhibition modulates the intracellular routing of gene delivery vehicles in HeLa cells, leading to productive transfection. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 156(1), pp.76–84.
- Vasilcanu, D. et al., 2004. The cyclolignan PPP induces activation loop-specific inhibition of tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor. Link to the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt apoptotic pathway. *Oncogene*, 23(47), pp.7854–62.
- Veldhoen, S., Laufer, S.D. & Restle, T., 2008. Recent developments in peptide-based nucleic acid delivery. *International journal of molecular sciences*, 9(7), pp.1276–320.
- Vercauteren, D. et al., 2010. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(3), pp.561–9.
- Vivès, E., Brodin, P. & Lebleu, B., 1997. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *The Journal of biological chemistry*, 272(25), pp.16010–16017.
- Wadia, J.S., Stan, R. V & Dowdy, S.F., 2004. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nature medicine*, 10(3), pp.310–5.
- Wagner, E. et al., 1990. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(9), pp.3410–4.
- Wahlestedt, C. et al., 2000. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *PNAS*, 97(10), pp.5633–5638.
- Walrant, A. et al., 2011. Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(1), pp.382–93.
- Walrant, A. et al., 2012. Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities. *Biochimica et biophysica acta*, 1818(7), pp.1755–63.
- Wancewicz, E. V et al., 2010. Peptide nucleic acids conjugated to short basic peptides show improved pharmacokinetics and antisense activity in adipose tissue. *Journal of medicinal chemistry*, 53(10), pp.3919–26.

- Wang, N. et al., 2013. Sustained production of a soluble IGF-I receptor by gutless adenovirus-transduced host cells protects from tumor growth in the liver. *Cancer gene therapy*, 20(4), pp.229–36.
- Watts, J.K. & Corey, D.R., 2012. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. *The Journal of pathology*, 226(2), pp.365–79.
- Wender, P. a et al., 2008. The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms. *Advanced drug delivery reviews*, 60(4-5), pp.452–72.
- Werner, H. & Bruchim, I., 2009. The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene. *Archives of physiology and biochemistry*, 115(2), pp.58–71.
- Whitehead, K. a et al., 2011. Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, pp.77–96.
- Williams, B.R., 1997. Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochemical Society transactions*, 25(2), pp.509–13.
- Wolf, Y. et al., 2006. Structural requirements for cellular uptake and antisense activity of peptide nucleic acids conjugated with various peptides. *Biochemistry*, 45(50), pp.14944–54.
- Wolfrum, C. et al., 2007. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nature biotechnology*, 25(10), pp.1149–57.
- Wrobel, I. & Collins, D., 1995. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochimica et biophysica acta*, 1235, pp.296–304.
- Wu, H. et al., 2004. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *The Journal of biological chemistry*, 279(17), pp.17181–9.
- Yee, D., 2012. Insulin-like growth factor receptor inhibitors: baby or the bathwater? *Journal of the National Cancer Institute*, 104(13), pp.975–81.
- Yin, H., Lu, Q. & Wood, M., 2008. Effective exon skipping and restoration of dystrophin expression by peptide nucleic acid antisense oligonucleotides in mdx mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(1), pp.38–45.
- Yokota, T. et al., 2009. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Annals of neurology*, 65(6), pp.667–76.
- Yoon, Y.H. et al., 2010. Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(11), pp.6030–7.
- Yuen, J.S.P. & Macaulay, V.M., 2008. Targeting the type 1 insulin-like growth factor receptor as a treatment for cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 12(5), pp.589–603.
- Zamaratski, E., Pradeepkumar, P.I. & Chattopadhyaya, J., 2001. A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 48(3), pp.189–208.

- Zamecnik, P.C. & Stephenson, M.L., 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Biochemistry*, 75(1), pp.280–284.
- Zamore, P.D. et al., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1), pp.25–33.
- Zhang, B. & Mallapragada, S., 2011. The mechanism of selective transfection mediated by pentablock copolymers; part II: nuclear entry and endosomal escape. *Acta biomaterialia*, 7(4), pp.1580–7.
- Zhang, X. & Godbey, W.T., 2006. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 58(4), pp.515–34.
- Zhang, Y. et al., 2011. Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection. *Gene therapy*, 18(4), pp.326–33.
- Zhou, J. et al., 2013. Functional in vivo delivery of multiplexed anti-HIV-1 siRNAs via a chemically synthesized aptamer with a sticky bridge. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(1), pp.192–200.
- Zhou, J. et al., 2008. Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(8), pp.1481–9.
- Zhou, J. et al., 2009. Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells. *Nucleic acids research*, 37(9), pp.3094–109.
- Zhou, J. & Rossi, J.J., 2010. Aptamer-targeted cell-specific RNA interference. *Silence*, 1(1), p.4.
- Zhou, P. et al., 2003. Novel binding and efficient cellular uptake of guanidine-based peptide nucleic acids (GPNA). *Journal of the American Chemical Society*, 125(23), pp.6878–9.
- Ziegler, A. & Seelig, J., 2008. Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds. *Biophysical journal*, 94(6), pp.2142–9.
- Ziegler, A. & Seelig, J., 2011. Contributions of glycosaminoglycan binding and clustering to the biological uptake of the nonamphipathic cell-penetrating peptide WR9. *Biochemistry*, 50(21), pp.4650–64.
- Zimmermann, T.S. et al., 2006. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*, 441(7089), pp.111–4.

Annexes

Annexe 1

A steric blocker of translation elongation inhibits IGF-1R expression and cell transformation

Sabine Lecosnier,^{*,†} Céline Cordier,^{*,†} Philippe Simon,^{*,†}
Jean-Christophe François,^{*,†,1,2} and Tula E. Saison-Behmoaras,^{*,†,1,2}

^{*}Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Unité Mixte de Recherche 7196, Paris, France; and [†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U565, Paris, France

ABSTRACT The insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) is involved in transformation, survival, mitogenesis and differentiation. It is overexpressed in many tumors and a validated target for anticancer therapy. In cell-free systems, polypyrimidic peptide nucleic acids (PNAs) can form triplex-like structures with messenger RNAs and halt the ribosomal machinery during the translation elongation. A 17-mer PNA that formed a PNA₂:mRNA complex with a purine-rich sequence located in the coding region of IGF-1R mRNA induced the synthesis of a truncated IGF-1R *in vitro*. This PNA down-regulated expression of the receptor by 70–80% in prostate cancer cells without affecting insulin receptor expression that exhibits high homology with IGF-1R. Inhibition occurs at the translational level, since the IGF-1R mRNA level measured by quantitative RT-PCR was not affected by PNA treatment. In addition, IGF-1R knockdown by PNA led to an attenuation of phosphorylation of downstream signaling pathways, PI3K/AKT and MAPK, involved in survival and mitogenesis and also to a decrease in cell transformation. Of the steric blockers tested, which included phosphorodiamidate morpholino oligomers and locked nucleic acids, PNA was unique in its ability to form triplex structures with mRNA and to arrest translation elongation.—Lecosnier, S., Cordier, C., Simon, P., François, J.-C., Saison-Behmoaras, T. E. A steric blocker of translation elongation inhibits IGF-1R expression and cell transformation. *FASEB J.* 25, 2201–2210 (2011). www.fasebj.org

Key Words: peptide nucleic acid • IGF signaling • triplex structure • prostate cancer

THE INSULIN-LIKE GROWTH factor 1 receptor (IGF-1R) is a transmembrane tyrosine kinase receptor involved in transformation, survival, mitogenesis, and differentiation (1). It functions as a heterotetramer of 2 extracellular ligand-binding α subunits and 2 β subunits that cross the plasma membrane. The β subunits encompass an intracellular domain devoted to the initiation of signal transduction cascades. IGF-1R is overexpressed in many tumors, such as cervical (2), prostate (3), breast (4), and pancreatic adenocarcinomas (5). Inhibiting IGF-1R-mediated signaling deals a severe blow to proliferation of cancer cells. Preclinical evidence show-

ing that targeting IGF-1R is effective in cancer treatment has been accumulating for almost 2 decades. Strategies used to block IGF-1R activity include antibodies (6–7), small-molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs; refs. 8–10), antisense oligonucleotides and antisense expression plasmids (11–13), short-interfering RNAs (siRNAs; refs. 14–15), triplex-forming oligonucleotides (16–17), and dominant negative and kinase defective mutants (18–20). Antibodies and TKIs are currently in clinical development and show both efficacy and toxicity (21). Although siRNAs effectively knock down IGF-1R, these agents have undesirable off-target effects and are a challenge to deliver (22).

Steric blocking oligonucleotides (ONs) are analogs of nucleic acids that bind sequence specifically to intracellular messenger RNAs (mRNAs) and interfere with splicing or translation without inducing target mRNA degradation. Their backbones confer nuclease resistance, and they often form complexes more stable than those formed with unmodified oligonucleotides. In contrast to antisense oligonucleotides or siRNAs, the RNA-ON hybrid does not need to be recognized by cellular endonucleases, such as ribonuclease H (RNase H) or argonaute 2, in order to achieve biological effects. Instead, hybrid formation and resultant steric interference prevent RNA recognition by relevant cellular machinery.

These sequence-specific steric blockers have a great potential as therapeutic agents for various diseases. When they target splice acceptor or donor sites, they are able to modulate splicing of premRNA (23). The most clinically advanced disease target of this type is Duchenne muscular dystrophy (24). Targeted to 5'UTR of an mRNA or translation initiation region, ONs prevent translation initiation (25). Targeting of the coding region of an mRNA to inhibit translation

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: T.E.S.-B., CNRS UMR7196; 57 rue Cuvier, CP 26, 75231 Paris Cedex 05, France. E-mail: tula@mnhn.fr; J.-C.F., INSERM U565, 57 rue Cuvier, CP 26, 75231 Paris Cedex 05, France. E-mail: francois@mnhn.fr

doi: 10.1096/fj.10-169540

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

elongation is more difficult because of the ability of the ribosome to unfold secondary structures and, therefore, to displace ONs bound to mRNA.

Some studies in cell-free systems have demonstrated that ONs can halt elongating ribosomes, and a few have shown the synthesis of truncated proteins. These studies have used ONs conjugated to a cross-linking agent, such as platinum (26–27) or polypyrimidinic peptide nucleic acids (PNAs), that form triplexes with mRNA (28–31). PNA oligomers are DNA mimics with a pseudopeptide backbone composed of achiral and uncharged *N*-(2-aminoethyl) glycine units. Polypyrimidic PNA can form triple helical structures in which a PNA:RNA duplex is bound by a second PNA that interacts with the RNA strand of the duplex *via* Hoogsteen base pairing. This PNA₂:RNA complex involves T·A:T and C+·G:C base triplets. There has been no report of translation elongation arrest with steric blockers within cells. In the present study, we used a pyrimidine-rich PNA sequence complementary to the coding region of IGF-1R mRNA. Treatment with the PNA resulted in synthesis of a truncated IGF-1R protein in a cell-free system. The PNA also down-regulated expression of IGF-1R in a human prostate cancer cell line. This down-regulation affected downstream signaling pathways involved in survival and proliferation and led to a significant decrease in transformation of cells.

MATERIALS AND METHODS

Oligonucleotides

RNAs, locked nucleic acids (LNAs), phosphodiester oligonucleotides (POs), and PNAs were synthesized by Eurogentec, S.A. (Seraing, Belgium). Phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs) were synthesized by GeneTools, LLC (Philomath, OR, USA). Sequences are listed in **Table 1**. The PNA control, NH₂-TATTCTTGTTCTTATCT-lys-lys, a scramble sequence of PNA 959, was prepared on an Expedite 8909 automated synthesizer (AME Biosciences, Sharnbrook, UK), as described previously (32). The PNA monomers were from Link Technologies (Bellshill, UK). The siRNA targeting human IGF-1R was previously described by Rochester *et al.* (14)

and was synthesized at Sigma (Lyon, France). The siRNA has the following sequence: sense strand, 5'-CAAUGAGUACAAC-UACCGCdTdT-3', and antisense strand, 5'-GCGGUAGUU-GUACUCAUUGdTdT-3'.

Spectroscopic experiments

Association and dissociation rates of the PNA, LNA, and PMO complexes with 17-nt complementary RNA were estimated by cooling/heating experiments, as described previously (28). Samples were prepared in a buffer containing 100 mM KCl and 10 mM sodium cacodylate (pH 7) and contained 1 μM RNA and 2 μM modified oligomer. The mixture was first heated to 90°C, then cooled to 10°C and heated to 90°C at a speed of 0.5°C/min. Absorbances at 260 and 330 nm were measured during the cooling and heating steps. The differences between these absorbances are represented as a function of the temperature. The reported midpoints of the transition (T_m) are equal to the maximums of the derivative of the curves.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Complementary RNA was 5'-³²P end labeled, as described previously (28), and purified using micro-Bio-Spin 30 chromatography columns (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). A mixture of 100 nM of unlabeled and 10 nM of ³²P-labeled complementary RNA was incubated in 50 mM Tris (pH 8 or 6) with increasing concentrations of PNAs, LNA, or PMO at 37°C for 10 min. The mixture was then loaded on 15% nondenaturing polyacrylamide gel or a 12% polyacrylamide/7 M urea denaturing gel. The gel buffers were either 100 mM Tris, 90 mM boric acid, and 1 mM EDTA (TBE) at pH 8.3 or 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES buffer) at pH 6. The nondenaturing gels were thermostatically maintained at 25°C. Imaging and quantitation were performed with a Typhoon imager and ImageQuant software (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

In vitro transcription and translation

The plasmid pIGFIR was constructed by insertion of the cDNA of IGF-1R (4.1 kb) into the pcDNA3 host vector downstream of the SP6 promoter. The IGF-1R expression plasmid pCVN-IGFIR (expressing the human IGF-1R cDNA driven by the SV40 promoter) was a gift from Dr. Renato Baserga (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA,

TABLE 1. *Properties of the steric blockers used in this study*

Name	Sequence	T_m (°C)	EMSA
PNA 330	TTTGTTTTCTTTCTTC	Hysteresis	Duplex+triplex
PNA 476	TTGTTCCCTGGTGTAT	80	Duplex
PNA 558	GGCTCCACGTCCTTGTT	>80	Duplex
PNA 883	ATACTTCCTGTATTCCT	70	Duplex
PNA 926	TTTTCATATCCTGTTTT	70	Duplex
PNA 959	TTATTTCTCTTTCTATG	Hysteresis	Duplex+triplex
LNA 959	<u>TTATTTCTCTTTCTATG</u>	>80	Duplex
PMO 959	CTGCTGTTATTTCTCTTTCTATGGA	70	Duplex

PNAs target the coding region of the IGF-1R mRNA. Number indicates the number of codons before the start of the targeted sequence. PNAs are listed from N to C termini and are antiparallel to mRNA. All PNAs contain a C-terminal lysine. LNA denotes a chimeric LNA sequence, where underscored bases are LNAs, and the others are deoxyribonucleotides. LNA and PMO are listed from 5' to 3' termini. T_m was determined from the UV-melting profiles at 260 nm. EMSAs were performed in nondenaturing polyacrylamide gels at pH 8.3.

USA; ref. 20). The cDNA was excised from pCVN-IGF1R with the restriction enzymes *Bam*H1 and *Xba*I. It was subcloned into pcDNA3 digested with the same enzymes and sequenced by Genome Express (Meylan, France). *In vitro* transcription was performed on *Bam*H1-linearized pIGF1R with the AmpliScribe SP6 high-yield transcription kit (Epicenter, Madison, WI, USA) in the presence of RNasin recombinant ribonuclease inhibitor (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The transcript was then purified with a Chroma Spin+TE-400 chromatography column (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France), followed by ethanol precipitation. The IGF-1R transcript (1.6 µg) was incubated with PNAs, PO, LNA, or PMO for 5 min at 37°C, and the mix was added to rabbit reticulocyte lysate (Promega) supplemented with amino acid mix (minus methionine), and ³⁵S-methionine (30 µCi). The translation was performed at 37°C for 20 min. With PO, 1 U of *Escherichia coli* RNase H (New England Biolabs, Hitchin, UK) was added to the final mixture. The ³⁵S-radiolabeled proteins were separated by Tris-glycine, SDS-PAGE. Imaging and quantitation were performed with a Typhoon imager and ImageQuant (GE Healthcare).

Transfection of cells

The human prostate cancer cell line DU145 and breast adenocarcinoma cell line MCF-7 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were grown in RPMI 1640 and DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), respectively, supplemented with 10% of FBS (Perbio; Thermo Scientific, Brebières, France) and 2 mM of L-glutamine (Invitrogen) in 5% CO₂ incubator at 37°C. Transient transfections were performed using the Amaxa Nucleofector electroporation system (Lonza, Köln, Germany) with the Cell Line 96-well nucleofector kit SE and the program CM-137. Cells were also permeabilized with streptolysin-*O*, as described by Faria *et al.* (33). Cells transfected without oligomer are called the untreated sample and were used as references in each experiment.

Western blot analyses

Following transfection, cells were seeded on plates and cultured. After indicated times, cells were harvested, and cellular proteins were extracted with RIPA 1× (Pierce, Rockford, IL, USA) supplemented with Complete protease inhibitor cocktails (Roche, Basel, Switzerland). Cellular proteins (30 µg) were subjected to reducing SDS-PAGE and transferred to membranes. Expression of IGF-1R was evaluated by blotting with a 1:200 dilution of rabbit polyclonal antibody against the C-terminal region of human IGF-1R-β (sc-713; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 1 h at room temperature and normalized using an antibody against β-actin (A5316; Sigma). Expression of IR was evaluated by blotting with a 1:200 dilution of mouse monoclonal antibody (sc-09; Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C and normalized using the anti-β-actin antibody.

For analysis of signaling pathways, at 24 h after transfection, cells were serum starved for 21 h and then stimulated with 100 nM of IGF-1 (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France) for 15 min. Proteins were extracted with RIPA containing phosphatase inhibitors (Cell Signaling, Beverly, MA, USA). Blots were performed with 1:1000 dilutions of rabbit polyclonal antibodies against human phosphorylated AKT, total AKT, phosphorylated p44/42MAPK, and total p44/42MAPK (Cell Signaling) overnight at 4°C.

Membranes were incubated with a 1:5000 dilution of secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (GE Healthcare), and bands were visualized by chemilumi-

nescence with ECL Plus Reagents (GE Healthcare). Western blot films were then scanned in tif format in grayscale using an Epson Expression 1600 Pro flatbed scanner (Epson, Nagano, Japan), followed by band quantification using either ImageQuant or ImageJ 1.43 software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) following the method outlined at lukemiller.org (<http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blot-with-image-j/>). Data are presented as means ± SD. Statistical analyses were conducted using Prism 5.0a software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Comparisons among groups were performed with the 1-way ANOVA test. If statistical significance was found, the Tukey *post hoc* test was used. Values of *P* < 0.05 were considered to be statistically significant; asterisks in figures indicate comparison to untreated samples.

RT-qPCR

Total cellular RNA was prepared using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) with DNase I treatment. Of each sample, 200 ng was reverse transcribed into cDNA using AffinityScript and random primers (Stratagene, La Jolla, CA, USA). With SideStep II SYBR Green QRT-PCR Master Mix (Stratagene), qPCR was performed using the primers for human IGF-1R: sense, 5'-AAAAACCTTCGCCTCATCC-3', and antisense, 5'-TGGTTGTCGAGGACGTAGAA-3'. Human GUS β was amplified as a control: sense, 5'-CGCCCTGCCTATCTGTATTC-3', and antisense, 5'-TCCCCACAGGGAGTGTGTAG-3'. The primers were designed with Roche's Profinder and synthesized by Sigma. Forty cycles of the following thermocycling conditions were used: 95°C for 30 s, 60°C for 1 min, 72°C for 1 min on a Stratagene Mx3000P instrument. The comparative cycle threshold method was used to calculate relative quantities of mRNA.

Soft agar colony formation assay

DU145 cells, permeabilized with streptolysin-*O*, were transfected with buffer, 0.5 µM PNA 959, or PNA scramble and plated immediately or after 24 h. Practically, 10⁴ cells were suspended in RPMI containing 10% FBS and 2 mM of L-glutamine with 0.3 or 0.7% agar and plated in 60-mm plastic Petri dishes on top of a precast semisolid 0.5% agar underlayer. After 15 or 21 d, colonies >0.05 mm were counted in dishes with a microscope at ×5. Colonies were photographed with a Leica microscope system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and a ×10 objective. Images at different depths were compiled and recorded with Metamorph (Universal Imaging Corp., Marlow, UK).

RESULTS

Characteristics of PNA:RNA complexes

We showed recently that T-rich PNAs can form triplex structures at physiological pH with complementary RNAs (28, 31). Triplex formation involves T·A:T and C+·G:C base triplets stabilized by Watson-Crick and Hoogsteen bonds. Cytosines must be protonated to form Hoogsteen bonds, which requires acidic pH. We selected 6 T-rich PNAs targeting the coding region of IGF-1R mRNA for *in vitro* analysis (Table 1). We chose 17-residue PNAs in order to have unique targets within the human transcriptome. PNAs were synthesized with a C-terminal lysine to enhance their solubility. The

sequences of PNAs 959 and 330 are most likely to form partial-triplex structures of those tested, since these two PNAs have the highest numbers of thymine (11 and 13, respectively) and a large central block of pyrimidines. UV-melting curves and EMSAs were performed to characterize the complexes formed by each PNA with a 17-nt complementary RNA.

Spectroscopic analyses revealed that the heating and cooling curves were superimposable for all PNA:RNA complexes except for complexes formed with PNAs 330 and 959 (Fig. 1 and Table 1). In these cases, temperatures of dissociation and association were different, suggesting that complexes were not at equilibrium during the experiment, which gave rise to hysteresis. This observation is consistent with triplex formation (28). For all of the complexes, midpoints of association and dissociation curves were high (70–85°C). Together, these results suggested that the 17-mer PNAs form very stable complexes with RNA involving duplex- or triplex-like structures even at neutral pH (Fig. 1 and Table 1).

EMSAs were performed to corroborate the hypothesis of triplex formation. Figure 2A shows that in non-denaturing conditions, a single complex that corresponds to the duplex was formed between the RNA and PNA 926. Similar results were obtained with PNAs 558, 883, and 476 (data not shown). At pH 8.2, in the presence of PNA 959 and 100 nM complementary RNA, one complex was observed at low PNA concentrations (<20 nM), whereas a slower migrating second complex appeared at higher PNA concentrations. Above 100 nM, only the slower migrating complex persisted (Fig. 2B). We also carried out an EMSA at pH 6 in order to allow cytosine protonation and increase triplex stability. Figure 2C shows that the concentration of PNA 959 required to form the triplex was 2 times less at pH 6 than under conditions of basic pH. Therefore, cytosine protonation is involved in the complex stability, as expected for triplexes formed with a cytosine-containing third strand. The EMSA of PNA 330 and comple-

mentary RNA shown in Fig. 2D was quite different from that obtained with PNA 959. There were two bands formed at both low and high PNA 330 concentrations. Although we do not have firm evidence that the complex formed is a triplex structure, the hysteresis shown in UV-melting curves suggests that it is not a duplex structure. To explore the stability of these complexes, we analyzed the samples on a denaturing polyacrylamide (7 M urea) gel. Under denaturing conditions (Fig. 2E), the complexes formed by PNA 959 and by 330 with respective complementary RNAs were more stable than the complex formed between PNA 926 and its complementary RNA. It is noteworthy that complexes 330 and 959 were resistant to these denaturing conditions, emphasizing the very high stabilities of these complexes.

Translation elongation arrest and production of a truncated protein in cell-free system

Cell-free translation of IGF-1R mRNA was performed in the presence of the PNAs targeting the coding region. As expected, PNAs 959 and 330, which presumably form triplexes with target sequences, were the only PNAs of those tested that halted translation elongation and resulted in formation of truncated proteins (Fig. 3). For the PNA 959, the mass of the truncated protein was ~109 kDa, similar to the mass of polypeptide chain obtained after RNase H cleavage of the RNA duplexed in the presence of a phosphodiester PO of the same base sequence (Fig. 3A). Interestingly, the proteins generated in the presence of PNA 330 migrated as a smear on the polyacrylamide gel, suggesting that a continuum of truncated products was produced (Fig. 3B). A possible explanation is that when the elongating ribosome stalls at the PNA block, it remains associated with the mRNA stalling ribosomes behind it, which are carrying even shorter polypeptides. In the case of PNA 959, the arrest of the elongating ribosome may induce its dissociation from the

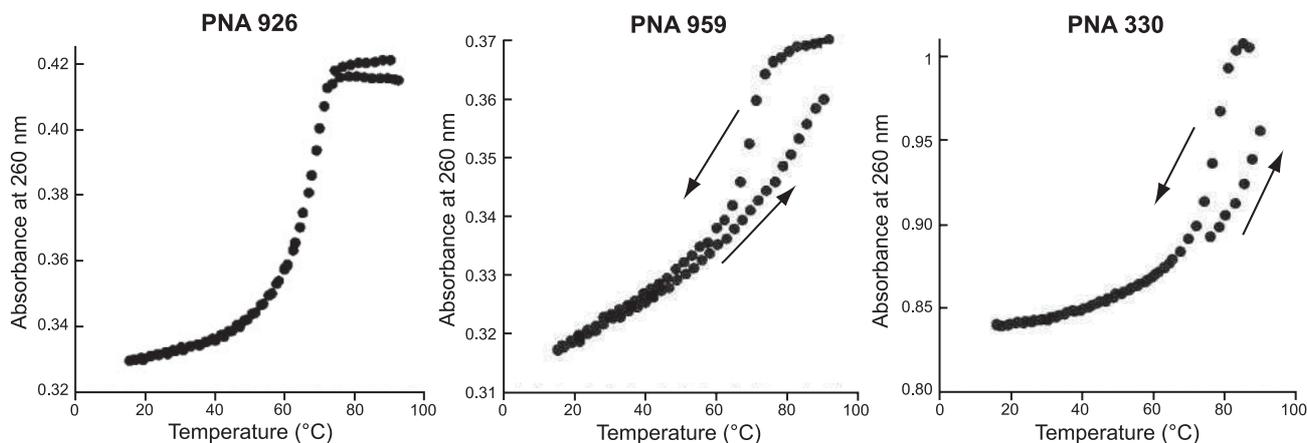


Figure 1. Spectroscopic analyses. Melting profiles of the complexes formed with indicated 17-mer PNAs (2 μ M) and complementary RNA (1 μ M) in a buffer containing 100 mM KCl and 10 mM sodium cacodylate at pH 7. Mixture was first heated to 90°C, then cooled to 10°C, and then heated to 90°C at a speed of 0.5°C/min. Absorbances at 260 and 330 nm were measured during the cooling and heating steps. For PNA 926, the heating and cooling profiles are superimposed. This is not the case for PNAs 959 and 330; a hysteresis was observed, and heating curves are shifted toward higher temperatures than cooling curves.

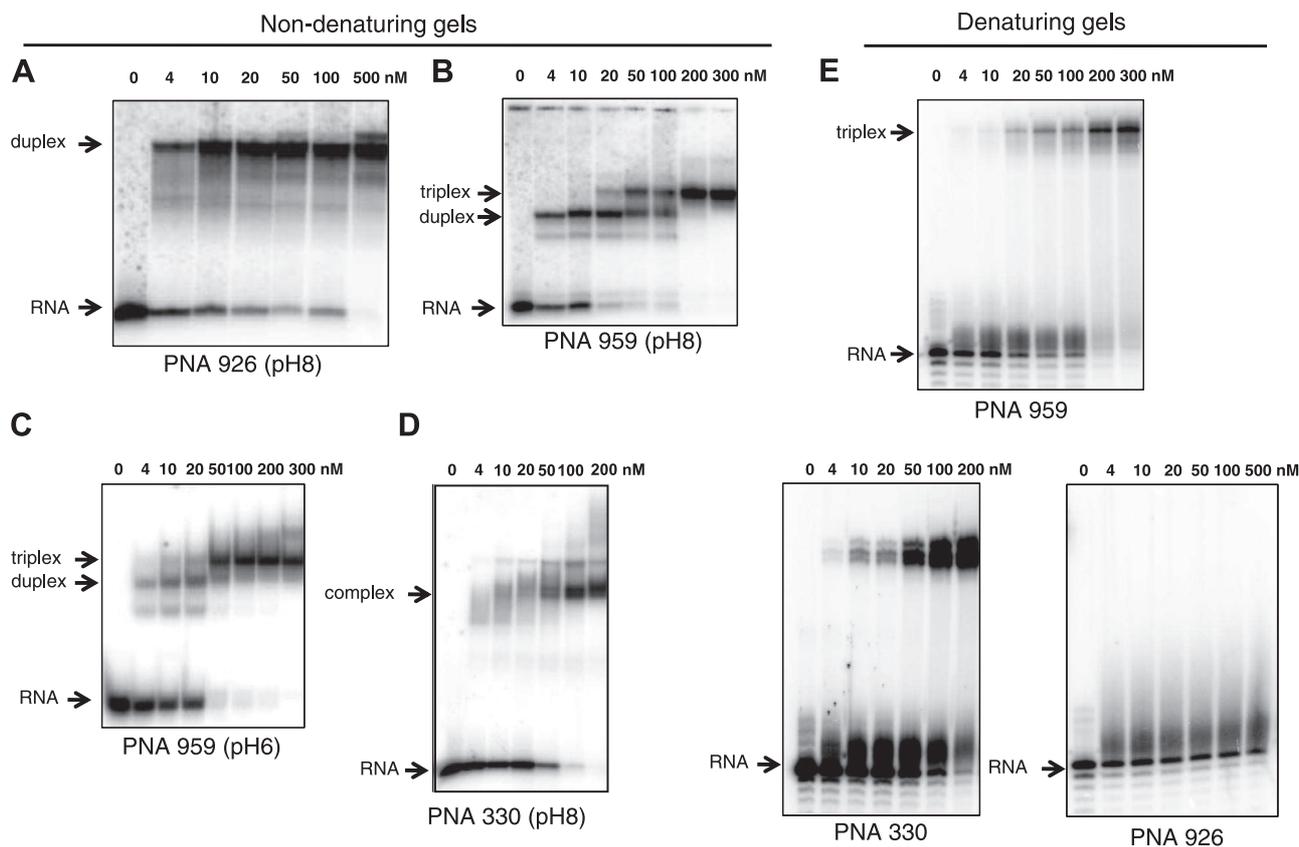


Figure 2. EMSA. *A–D*) Mixture of 100 nM of unlabeled and 10 nM of 32 P-labeled RNA was incubated in 50 mM Tris buffer (pH 8 or 6 as indicated below the gels) with increasing concentrations of indicated PNA. Mixture was allowed to hybridize for 10 min at room temperature and then was loaded on 15% nondenaturing polyacrylamide gel. Gels and buffer contained TBE buffer at pH 8.3 or MES buffer at pH 6. *A*) PNA 926, pH 8. *B*) PNA 959, pH 8. *C*) PNA 959, pH 6. *D*) PNA 330, pH 8. *E*) Indicated complexes analyzed on a 12% polyacrylamide/7 M urea denaturing gels. Bottom bands are unhybridized RNAs; slower migrating bands are RNA:PNA hybrids.

mRNA, thereby allowing the accumulation of a single truncated polypeptide chain. Degradation of a PNA 330-induced truncated protein might also lead to the observed continuum of protein products. Although PNAs 476 and 558 formed stable duplexes, they did not produce truncated proteins. This screening suggests, as shown previously (30), that duplex structures are not able to stop elongating ribosomes on an eukaryotic mRNA.

We also assessed the ability of other chemistries to block elongation. LNAs and PMOs are known to be good steric blockers (34–36). Rules for design of chimeric LNAs optimal for triplex formation (37) were followed. Our molecule alternates LNA and DNA nucleotides and maximizes the number of thymine LNA residues, and the C-terminal residue is an LNA. For the PMO, we chose a 25-nt sequence. This length is neces-

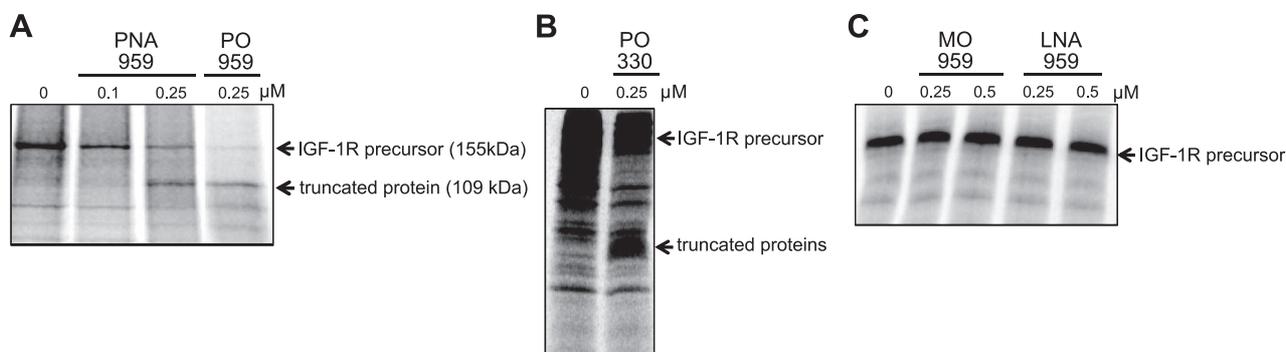


Figure 3. Effect of PNAs on cell-free translation of IGF-1R mRNA. *In vitro* transcribed IGF-1R mRNA was preincubated with PNA 959, PO 959, LNA 959, or PMO 959 at the concentrations indicated above the lanes and translated in rabbit reticulocyte lysate with 35 S-methionine as described in Materials and Methods. Reactions were carried out for 20 min at 37°C and analyzed by SDS-PAGE. PO was used in presence of RNase H to produce a control of truncated protein size. In this cell-free system, the IGF-1R protein is not processed, and its precursor (155 kDa) is observed. *A*) PNA and PO 959. *B*) PNA 330. *C*) LNA and PMO 959.

sary to form a duplex with $T_m \geq 70^\circ\text{C}$. Although PNA 959 formed a triplex-like structure, neither the LNA of the same sequence nor the PMO 959 did, as shown by the absence of hysteresis profile in melting experiments (Table 1). Figure 3C shows that these oligomers also failed to stop translation elongation. This indicates that PNAs are more prone to formation of triple helices under physiological conditions than were these other modified oligomers.

PNA 959 specifically inhibits IGF-1R expression in prostate cancer cell line DU145

Overexpression of IGF-1R protein induces growth, neoplastic transformation, and protection from apoptosis. Furthermore, this receptor is reportedly up-regulated during the progression to androgen-independent prostate cancer *in vivo* (38), and expression of an antisense RNA complementary to IGF-1R blocks the growth of rat prostate tumors *in vivo* (39). This suggests that the IGF-1R has potential as a target for treatment of androgen-independent prostate cancer. Among metastatic prostate cancer lines DU145, PC3, and LNCaP, DU145 cells have the highest IGF-1R levels (14). Thus, we chose to work with androgen-independent DU145 cells.

PNA 959 and the PNA control containing 2 C-terminal lysines were introduced into the cells by nucleofection. To assess the expression of functional IGF-1R- β after the treatment, immunoblotting analysis using an antibody targeting the C terminus of IGF-1R was performed on total cell lysates (Fig. 4A, B). Figure 4B shows that in cells treated with 1 μM PNA 959, a strong inhibition of IGF-1R expression was achieved, whereas the control PNA sequence did not affect IGF-1R levels.

Figure 4C shows IGF-1R inhibition as a function of PNA concentration; almost complete inhibition of IGF-1R was observed at 1.5 μM PNA 959, 48 h after treatment. At 1 μM PNA 959, kinetic studies indicated that the inhibition increased over time and reached $66 \pm 14\%$ inhibition between 24 and 48 h, and this level was maintained up to 72 h (data not shown). Although PNA 330 formed complexes as stable as those formed with PNA 959, the latter was almost twice as efficient as the inhibitor of IGF-1R expression in cells at 1 μM (Supplemental Fig. S1). Therefore, we chose PNA 959 for the subsequent cellular experiments.

The insulin receptor (IR) is structurally and functionally related to IGF-1R. The homologous target sequence of PNA 959 in IR transcript shares 10 bases (8 contiguous) over 17 in common with the IGF1-R transcript (Supplemental Fig. S2). Supplemental Fig. S3 shows that IR is not affected under conditions where IGF1-R was down-regulated by PNA 959 treatment. Therefore, PNA 959 is selective for IGF-1R.

Mechanism of the cellular inhibition

To obtain further insight into the mechanism by which PNA 959 causes the IGF-1R down-regulation, we have investigated its effect on IGF-1R mRNA level. Unlike siRNAs, steric blockers do not induce target mRNA hydrolysis. Therefore, as a positive control, we have used a previously described siRNA that specifically targets IGF-1R in DU 145 cells (14). Figure 5 shows that the treatment of DU 145 cells with 0.05 μM of siRNA decreased protein levels by $76.8 \pm 12.4\%$. The decrease of IGF-1R protein level was concomitant to the decrease of mRNA level by $47 \pm 7\%$ as quantified by RT-qPCR. We have quantified the mRNA levels in the experi-

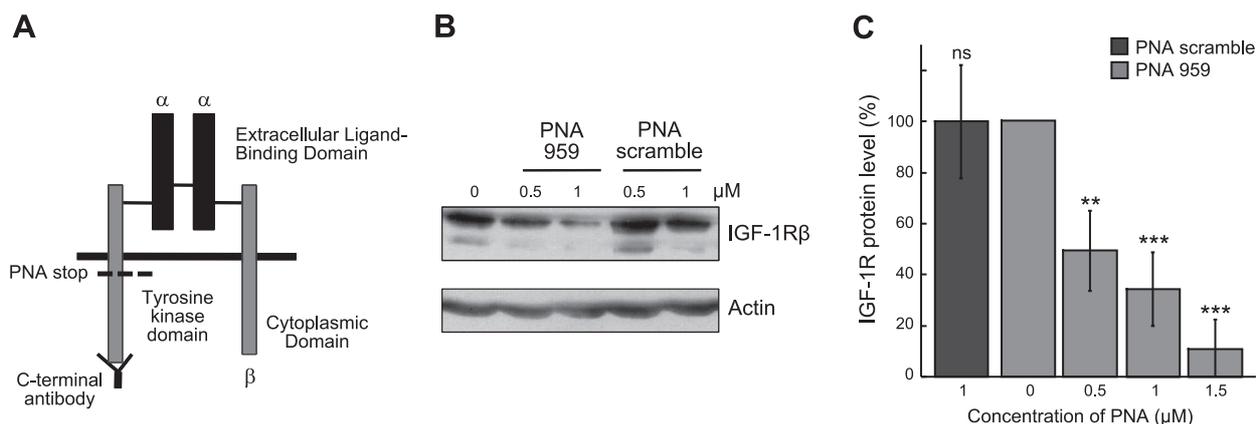


Figure 4. Effect of PNAs on expression of IGF-1R in DU145 cells. **A)** Structure of IGF-1R. This heterotetramer is composed of 2 extracellular ligand-binding α subunits and 2 transmembrane β subunits linked by disulfide bonds. The β subunits carry the intracellular tyrosine kinase domain and transduce the signal. PNA 959 produces a truncated protein, whose β subunit retains the membrane domain but not the intracellular domain. **B)** Inhibition of expression of IGF-1R in DU145 human prostate cancer cells with PNA 959. DU145 cells were nucleofected with PNA or left untreated and were seeded on plates. Total protein was extracted after 48 h. Immunoblotting was performed with a C-terminal antibody against IGF-1R- β (90 kDa) and an antibody against β -actin (42 kDa). The 2 bands stained with anti-IGF-1R- β correspond to the 2 known isomers of the protein. **C)** IGF-1R protein levels were quantified by densitometry after correcting for β -actin protein levels on immunoblots of three sets of independently prepared lysates. Levels were calculated by comparison with untreated sample. Plot corresponds to quantitative analysis of 3 independent experiments with means \pm sd. ns = nonsignificant, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

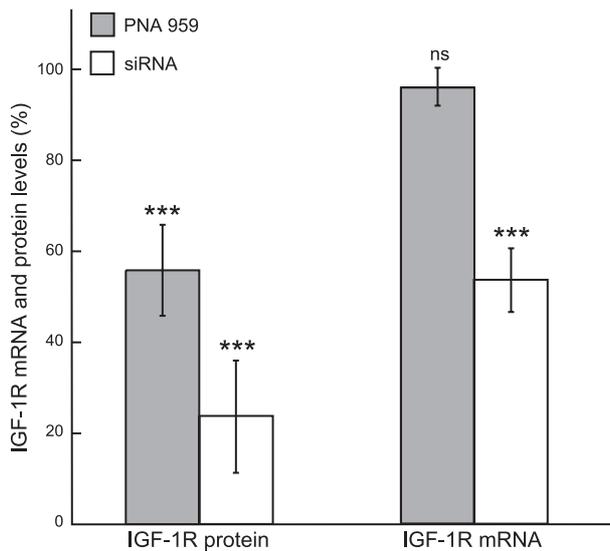


Figure 5. Expression of IGF-1R mRNA in the presence of siRNA or PNA 959 in DU145 cells. Expression levels of IGF-1R mRNA were measured by RT-qPCR. DU145 cells were nucleofected with 1 μ M PNA 959 or 0.05 μ M siRNA and incubated for 48 h. Protein extractions and Western blot analyses were performed with half of the cells. mRNA was extracted from the other half and retrotranscribed, and cDNA was analyzed by qPCR with GUS- β as an internal standard. Comparative cycle threshold method was used to calculate relative quantities of mRNA. For each experiment, inhibition was calculated compared to levels of mRNA from untreated cells that are assigned as 100% (not shown). Plot corresponds to quantitative analysis of 5 independent experiments with means \pm SD. *** $P < 0.001$.

ments, where, compared to the scramble sequence, 1 μ M PNA 959 inhibited the IGF-1R protein level by $66 \pm 14\%$ (see Fig. 4). Figure 5 shows that in similar conditions, IGF-1R mRNA level was not affected, whereas IGF-1R was down-regulated by 44%. This indicates that PNA 959 that interacts with the mRNA does not induce its degradation. The PNA most probably acts as a steric blocker in DU 145 cells, as it inhibits protein synthesis at a translational level. Our data show that PNA 959 does not inhibit transcription of the IGF-1R gene. Although PNAs may bind to genomic DNA after strand invasion (40), it is not the case for the PNA 959 sequence that spans the junction of exon 14 (on 11 bases) and exon 15 (on 6 bases) (Supplemental Fig. S2). Moreover, our data show that the PNA-mRNA hybrid is not detected by nonsense-mediated mRNA decay (NMD) machinery that degrades mRNAs that have in-frame premature termination codons (41).

Biological effects of IGF-1R knockdown by PNA 959

The binding of IGF-1R to its ligand IGF-1 results in tyrosine kinase activation and stimulation of the downstream signaling pathways Ras/MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT (1). A cascade of responses is triggered from proliferation to survival and motility and, potentially, tumor progression. AKT and

ERK1/2 are intermediates of the signaling pathways PI3K/AKT and MAPK, respectively. They are phosphorylated on IGF-1 binding. We chose to work at 0.5 μ M of PNA 959 in order to assess biological effects when 50% of receptor expression was inhibited. At 2 d after transfection of PNA 959 into DU145 cells, we observed a decrease in IGF-1-induced phosphorylation of the signaling intermediates AKT and ERK1/2 (Fig. 6). PNA 959 treatment specifically inhibited the phosphorylation of AKT and ERK1/2 by 64 and 79%, respectively. PNA scramble did not affect pAKT level and induced a weak inhibition (20%) of pERK1/2. The inhibitions were maintained for at least 3 d (data not shown). Therefore, treatment of cells with PNA 959 inhibits phosphorylation of important regulators of cell growth and survival.

IGF-1R is crucial for malignant transformation (42); therefore, we assessed the effects of PNA 959 on cell transformation. Anchorage-independent growth in the semisolid medium of soft agar is a strong indicator of the transformed phenotype and a stringent test of mitogenic capacity, because several cycles of cell division are required to form detectable colonies. Therefore, soft agar colony formation assays were performed to assess the ability of DU145 cells treated with the PNA to transform. Cells were seeded in soft agar 24 h after PNA 959 treatment. Cells treated with 0.5 μ M PNA 959 formed few, small colonies, in sharp contrast to untreated cells (64% inhibition; $P < 0.01$), whereas those treated with 0.5 μ M PNA scramble formed numerous colonies with larger diameter (32% inhibition, $P < 0.05$; Fig. 7 and Supplemental Fig. S4). When cells were seeded in soft agar directly after PNA treatment, colony formation was reduced by 65% with 0.5 μ M PNA and by 25% with 0.5 μ M PNA scramble. Altogether, these

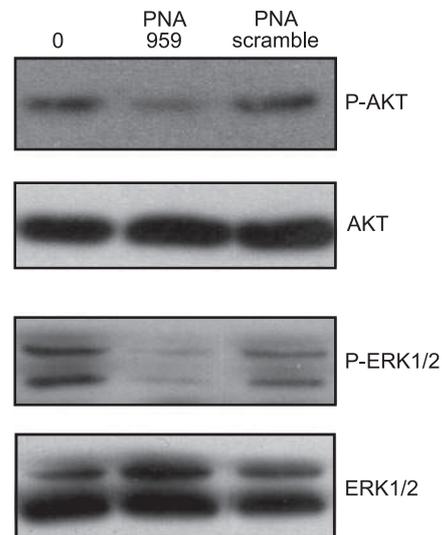


Figure 6. Effect of PNA 959 on IGF signaling. DU145 cells, permeabilized with streptolysin-O, were transfected with buffer, 0.5 μ M PNA 959, or 0.5 μ M control PNA. After 24 h, cultures were serum starved for 21 h, then stimulated with 100 nM of IGF-1 for 15 min. Total cell proteins were extracted. Levels of phosphorylated AKT and phosphorylated ERK1/2 were determined by immunoblotting; after a gentle stripping step, levels of total AKT and ERK1/2 were determined.

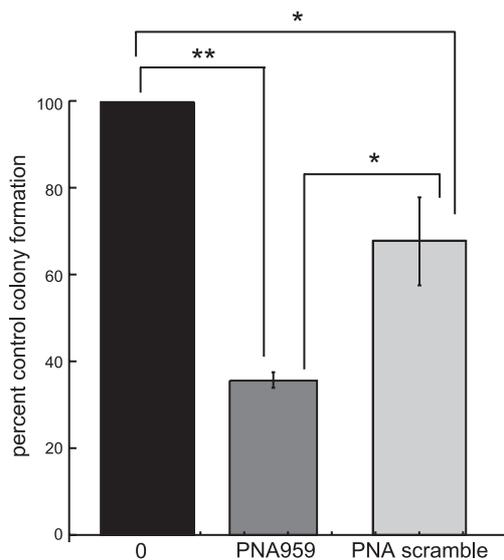


Figure 7. Effect of PNA on anchorage-independent colony formation by DU145 cells. DU145 cells, permeabilized with streptolysin-*O*, were transfected with buffer or 0.5 μ M PNA 959 or PNA scramble and plated after 24 h. Data are expressed as percentage control colony formation for untreated cells. Plot corresponds to quantitative analysis of 2 independent experiments with means \pm SD. Compared with control scramble PNA-transfected cells, growth of PNA 959-transfected cells lines was significantly reduced. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

results show PNA 959 specifically and strongly inhibited transformation of these prostate cancer cells.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate a new approach for inhibition of IGF-1R expression. A PNA complementary to a coding region in the IGF-1R mRNA served as a steric blocker, inhibiting translation elongation from the IGF-1R mRNA. In cell-based assays, the PNA effectively silenced IGF-1R gene expression and inhibited clonogenic survival. The two main classes of agents that have been used to block IGF-1R function are antibodies and TKIs. Both approaches are in preclinical or clinical development. Although promising, toxic effects, such as hyperglycemia or hematological or metabolic toxicity, are observed (21). Moreover, since IGF-1 signaling has neuroprotective effects, there are some concerns that TKIs that can cross the blood-brain barrier would have neurological toxicity. Among nucleic acid-based strategies, siRNAs that knock down IGF-1R have been reported, but may trigger host immune responses (43–44) and deregulate nontargeted genes (45). Antisense oligonucleotides also encounter specificity problems, since short heteroduplexes of 6 bp are sufficient to be recognized and cleaved by RNase H (46). The steric blocker approach may have a higher specificity than strategies dependent on RNA cleavage, since binding to a secondary site is less likely to induce a biological effect. The IGF-1R is implicated in several cancers,

including both prostate and breast cancer. To show that IGF-1R down-regulation in androgen-independent DU 145 prostate cancer cell line is not cell-type specific phenomenon, we have transfected the PNA 959 in MCF-7 human breast cancer cells. Supplemental Fig. S5 shows that in MCF-7 cells treated for 24 h with 1 μ M PNA 959, a strong inhibition of IGF-1R expression was achieved, whereas the control scramble PNA had no effect. Therefore, IGF-1R that is considered as a rational therapeutic target in both prostate and breast cancer can be targeted by steric blocker antisense PNA. PNAs are well tolerated in cells (47) and are highly specific, as single mismatches greatly destabilize PNA:RNA complexes (48). By targeting the mRNA, the PNA strategy circumvents a major obstacle to design antibodies and TKI, which is the high homology between IR and IGF-1R. Moreover, unlike siRNAs and antisense oligonucleotides, PNAs can invade stable secondary structures of mRNA (49). A limitation of our strategy is that PNAs are uncharged molecules that are poorly taken up by mammalian cells. To overcome the problem of delivery, PNAs conjugated to cell-penetrating peptides have been widely studied (50). A PNA conjugated to four lysines systemically injected into mice had activity in organs, including heart, lung, and muscle (23). Another possible solution to the uptake problem is to conjugate the PNA to oligophosphonate groups (51).

We hypothesize that the PNA investigated here inhibits IGF-1R expression by sterically blocking translation elongation; however, this mechanism was not absolutely confirmed in cells. In cellular experiments, we showed that the inhibition occurred at a translational level and that the mRNA was not degraded. Although we detected a truncated form of the protein in our cell-free translation system, the truncated protein was not observed in DU145 cells, and use of an antibody targeting the N-terminal region of IGF-1R did indicate a decrease of the receptor expression (data not shown). One possible reason is that the truncated proteins may be degraded by proteasomes. Another reason could be that the ribosomes halted at the PNA block remain associated with the mRNA and prevent other translation cycles. Finally, we cannot rule out the possibility that in cells, the PNA affects translation initiation or that the PNA induces localization of the mRNA to a compartment that prevents its translation.

The LNA that we tested was designed to form a triplex structure, but we did not detect an LNA₂-RNA complex. In both the LNA and the 17-mer PNA 959, only 3 bases on either side of the central block of 11 pyrimidines cannot form Hoogsteen bonds with the mRNA. These flanking residues may be an obstacle to triplex formation for the charged and less flexible LNA but not the PNA. The tested PMO was also inactive. Our data support the hypothesis that the triplex is necessary to stop translation elongation on eukaryotic mRNAs. All PNAs that formed duplex structures were inactive despite the high stability of complexes measured in thermal denaturation studies. It appears that bulk rather than stability is the essential parameter for

inhibition of elongating ribosomes in the eukaryote system. The advantage of blocking elongation rather than translation initiation is that the complex can be formed anywhere on the mRNA, not just at the 5'-end mRNA. Further, with incorporation of pseudoisocytosines in one PNA strand, the pH dependence of the Hoogsteen bonds can be avoided (52), making sequences containing cytosines potential targets. In addition to therapeutic applications, PNA steric blockers could be used as tools to understand mechanisms of mRNA regulation or to study the translation elongation. Evidence suggests that IGF-IR signaling is required for survival and growth when prostate cancer cells progress to androgen independence. FJ

The authors thank Loïc Perrouault and Karen Haug for their technical assistance. The authors are grateful to Dr. Renato Baserga (Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA) for providing human IGF-IR cDNA. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Centre National de la Recherche Scientifique. S.L. and C.C. are doctoral fellows supported by the French Ministry for Research.

REFERENCES

- Adams, T. E., Epa, V. C., Garrett, T. P., and Ward, C. W. (2000) Structure and function of the type I insulin-like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1050–1093
- Steller, M. A., Delgado, C. H., Bartels, C. J., Woodworth, C. D., and Zou, Z. (1996) Overexpression of the insulin-like growth factor-I receptor and autocrine stimulation in human cervical cancer cells. *Cancer Res.* **56**, 1761–1765
- Hellawell, G. O., Turner, G. D., Davies, D. R., Poulson, R., Brewster, S. F., and Macaulay, V. M. (2002) Expression of the type I insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res.* **62**, 2942–2950
- Resnik, J. L., Reichart, D. B., Huey, K., Webster, N. J., and Seely, B. L. (1998) Elevated insulin-like growth factor I receptor autophosphorylation and kinase activity in human breast cancer. *Cancer Res.* **58**, 1159–1164
- Kwon, J., Stephan, S., Mukhopadhyay, A., Muders, M. H., Dutta, S. K., Lau, J. S., and Mukhopadhyay, D. (2009) Insulin receptor substrate-2 mediated insulin-like growth factor-I receptor overexpression in pancreatic adenocarcinoma through protein kinase Cdelta. *Cancer Res.* **69**, 1350–1357
- Dallas, N. A., Xia, L., Fan, F., Gray, M. J., Gaur, P., van Buren, G., 2nd, Samuel, S., Kim, M. P., Lim, S. J., and Ellis, L. M. (2009) Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res.* **69**, 1951–1957
- Sachdev, D., Li, S. L., Hartell, J. S., Fujita-Yamaguchi, Y., Miller, J. S., and Yee, D. (2003) A chimeric humanized single-chain antibody against the type I insulin-like growth factor (IGF) receptor renders breast cancer cells refractory to the mitogenic effects of IGF-I. *Cancer Res.* **63**, 627–635
- Garcia-Echeverria, C., Pearson, M. A., Marti, A., Meyer, T., Mestan, J., Zimmermann, J., Gao, J., Brueggen, J., Capraro, H. G., Cozens, R., Evans, D. B., Fabbro, D., Furet, P., Porta, D. G., Liebetanz, J., Martiny-Baron, G., Ruetz, S., and Hofmann, F. (2004) In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* **5**, 231–239
- Ji, Q. S., Mulvihill, M. J., Rosenfeld-Franklin, M., Cooke, A., Feng, L., Mak, G., O'Connor, M., Yao, Y., Pirritt, C., Buck, E., Eyzaguirre, A., Arnold, L. D., Gibson, N. W., and Pachter, J. A. (2007) A novel, potent, and selective insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor blocks insulin-like growth factor-I receptor signaling in vitro and inhibits insulin-like growth factor-I receptor dependent tumor growth in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 2158–2167
- Moser, C., Schachtschneider, P., Lang, S. A., Gaumann, A., Mori, A., Zimmermann, J., Schlitt, H. J., Geissler, E. K., and Stoeltzing, O. (2008) Inhibition of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) using NVP-AEW541, a small molecule kinase inhibitor, reduces orthotopic pancreatic cancer growth and angiogenesis. *Eur. J. Cancer* **44**, 1577–1586
- Chernicky, C. L., Tan, H., Yi, L., Loret de Mola, J. R., and Ilan, J. (2002) Treatment of murine breast cancer cells with antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor decreases the level of plasminogen activator transcripts, inhibits cell growth in vitro, and reduces tumorigenesis in vivo. *Mol. Pathol.* **55**, 102–109
- D'Cunja, J., Shalaby, T., Rivera, P., von Buren, A., Patti, R., Heppner, F. L., Arcaro, A., Rorke-Adams, L. B., Phillips, P. C., and Grotzer, M. A. (2007) Antisense treatment of IGF-IR induces apoptosis and enhances chemosensitivity in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumours cells. *Eur. J. Cancer* **43**, 1581–1589
- Furukawa, J., Wraight, C. J., Freier, S. M., Peralta, E., Atley, L. M., Monia, B. P., Gleave, M. E., and Cox, M. E. (2010) Antisense oligonucleotide targeting of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) in prostate cancer. *Prostate* **70**, 206–218
- Rochester, M. A., Riedemann, J., Hellawell, G. O., Brewster, S. F., and Macaulay, V. M. (2005) Silencing of the IGF1R gene enhances sensitivity to DNA-damaging agents in both PTEN wild-type and mutant human prostate cancer. *Cancer Gene Ther.* **12**, 90–100
- Zhang, H., Pelzer, A. M., Kiang, D. T., and Yee, D. (2007) Down-regulation of type I insulin-like growth factor receptor increases sensitivity of breast cancer cells to insulin. *Cancer Res.* **67**, 391–397
- Oussedik, K., Francois, J. C., Halby, L., Senamaud-Beaufort, C., Toutirais, G., Dallavalle, S., Pommier, Y., Pisano, C., and Arimondo, P. B. (2010) Sequence-specific targeting of IGF-I and IGF-IR genes by camptothecins. *FASEB J.* **24**, 2235–2244
- Francois, J. C., Lacoste, J., Lacroix, L., and Mergny, J. L. (2000) Design of antisense and triplex-forming oligonucleotides. *Methods Enzymol.* **313**, 74–95
- Min, Y., Adachi, Y., Yamamoto, H., Ito, H., Itoh, F., Lee, C. T., Nadaf, S., Carbone, D. P., and Imai, K. (2003) Genetic blockade of the insulin-like growth factor-I receptor: a promising strategy for human pancreatic cancer. *Cancer Res.* **63**, 6432–6441
- Reinmuth, N., Fan, F., Liu, W., Parikh, A. A., Stoeltzing, O., Jung, Y. D., Bucana, C. D., Radinsky, R., Gallick, G. E., and Ellis, L. M. (2002) Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon. *Cancer Lab. Invest.* **82**, 1377–1389
- Reiss, K., D'Ambrosio, C., Tu, X., Tu, C., and Baserga, R. (1998) Inhibition of tumor growth by a dominant negative mutant of the insulin-like growth factor I receptor with a bystander effect. *Clin. Cancer Res.* **4**, 2647–2655
- Gualberto, A., and Pollak, M. (2009) Emerging role of insulin-like growth factor receptor inhibitors in oncology: early clinical trial results and future directions. *Oncogene* **28**, 3009–3021
- Jackson, A. L., and Linsley, P. S. (2004) Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet.* **20**, 521–524
- Sazani, P., Gemignani, F., Kang, S. H., Maier, M. A., Manoharan, M., Persmark, M., Bortner, D., and Kole, R. (2002) Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1228–1233
- Yin, H., Betts, C., Saleh, A. F., Ivanova, G. D., Lee, H., Seow, Y., Kim, D., Gait, M. J., and Wood, M. J. (2010) Optimization of peptide nucleic acid antisense oligonucleotides for local and systemic dystrophin splice correction in the *mdx* mouse. *Mol. Ther.* **18**, 819–827
- Baker, B. F., Lot, S. S., Condon, T. P., Cheng-Flournoy, S., Lesnik, E. A., Sasmor, H. M., and Bennett, C. F. (1997) 2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 11994–12000
- Boudvillain, M., Guerin, M., Dalbies, R., Saison-Behmoaras, T., and Leng, M. (1997) Transplatin-modified oligo(2'-O-methyl ribonucleotide)s: a new tool for selective modulation of gene expression. *Biochemistry* **36**, 2925–2931

27. Gee, J. E., Robbins, I., van der Laan, A. C., van Boom, J. H., Colombier, C., Leng, M., Raible, A. M., Nelson, J. S., and Lebleu, B. (1998) Assessment of high-affinity hybridization, RNase H cleavage, and covalent linkage in translation arrest by antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **8**, 103–111
28. Boutimah-Hamoudi, F., Leforestier, E., Senamaud-Beaufort, C., Nielsen, P. E., Giovannangeli, C., and Saison-Behmoaras, T. E. (2007) Cellular antisense activity of peptide nucleic acid (PNAs) targeted to HIV-1 polypurine tract (PPT) containing RNA. *Nucleic Acids Res.* **35**, 3907–3917
29. Dias, N., Senamaud-Beaufort, C., Forestier El, E., Auvin, C., Helene, C., and Ester Saison-Behmoaras, T. (2002) RNA hairpin invasion and ribosome elongation arrest by mixed base PNA oligomer. *J. Mol. Biol.* **320**, 489–501
30. Knudsen, H., and Nielsen, P. E. (1996) Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res.* **24**, 494–500
31. Senamaud-Beaufort, C., Leforestier, E., and Saison-Behmoaras, T. E. (2003) Short pyrimidine stretches containing mixed base PNAs are versatile tools to induce translation elongation arrest and truncated protein synthesis. *Oligonucleotides* **13**, 465–478
32. Mayfield, L. D., and Corey, D. R. (1999) Automated synthesis of peptide nucleic acids and peptide nucleic acid-peptide conjugates. *Anal. Biochem.* **268**, 401–404
33. Faria, M., Spiller, D. G., Dubertret, C., Nelson, J. S., White, M. R., Scherman, D., Helene, C., and Giovannangeli, C. (2001) Phosphoramidate oligonucleotides as potent antisense molecules in cells and in vivo. *Nat. Biotechnol.* **19**, 40–44
34. Wu, B., Moulton, H. M., Iversen, P. L., Jiang, J., Li, J., Spurney, C. F., Sali, A., Guerrero, A. D., Nagaraju, K., Doran, T., Lu, P., Xiao, X., and Lu, Q. L. (2008) Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14814–14819
35. Roberts, J., Palma, E., Sazani, P., Orum, H., Cho, M., and Kole, R. (2006) Efficient and persistent splice switching by systemically delivered LNA oligonucleotides in mice. *Mol. Ther.* **14**, 471–475
36. Nulf, C. J., and Corey, D. (2004) Intracellular inhibition of hepatitis C virus (HCV) internal ribosomal entry site (IRES)-dependent translation by peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs). *Nucleic Acids Res.* **32**, 3792–3798
37. Vester, B., and Wengel, J. (2004) LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* **43**, 13233–13241
38. Nickerson, T., Chang, F., Lorimer, D., Smeekens, S. P., Sawyers, C. L., and Pollak, M. (2001) In vivo progression of LAPC-9 and LNCaP prostate cancer models to androgen independence is associated with increased expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor (IGF-IR). *Cancer Res.* **61**, 6276–6280
39. Burfeind, P., Chernicky, C. L., Rininsland, F., and Ilan, J. (1996) Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7263–7268
40. Rogers, F. A., Vasquez, K. M., Egholm, M., and Glazer, P. M. (2002) Site-directed recombination via bifunctional PNA-DNA conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16695–16700
41. Shyu, A. B., Wilkinson, M. F., and van Hoof, A. (2008) Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J.* **27**, 471–481
42. Valentini, B., and Baserga, R. (2001) IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol. Pathol.* **54**, 133–137
43. Reynolds, A., Anderson, E. M., Vermeulen, A., Fedorov, Y., Robinson, K., Leake, D., Karpilow, J., Marshall, W. S., and Khvorova, A. (2006) Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *RNA* **12**, 988–993
44. Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S., and Hartmann, G. (2005) Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* **11**, 263–270
45. Jackson, A. L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., Johnson, J. M., Lim, L., Karpilow, J., Nichols, K., Marshall, W., Khvorova, A., and Linsley, P. S. (2006) Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “off-target” transcript silencing. *RNA* **12**, 1197–1205
46. Crooke, S. T., Lemonidis, K. M., Neilson, L., Griffey, R., Lesnik, E. A., and Monia, B. P. (1995) Kinetic characteristics of Escherichia coli RNase H1: cleavage of various antisense oligonucleotide RNA duplexes. *Biochem. J.* **312**, 599–608
47. Nielsen, P. E. (2002) PNA technology. *Methods Mol. Biol.* **208**, 3–26
48. Dias, N., Dheur, S., Nielsen, P. E., Gryaznov, S., Van Aerschot, A., Herdewijn, P., Helene, C., and Saison-Behmoaras, T. E. (1999) Antisense PNA tridecamers targeted to the coding region of Ha-ras mRNA arrest polypeptide chain elongation. *J. Mol. Biol.* **294**, 403–416
49. Armitage, B. A. (2003) The impact of nucleic acid secondary structure on PNA hybridization. *Drug Discov. Today* **8**, 222–228
50. Bendifallah, N., Rasmussen, F. W., Zachar, V., Ebbesen, P., Nielsen, P. E., and Koppelhus, U. (2006) Evaluation of cell-penetrating peptides (CPPs) as vehicles for intracellular delivery of antisense peptide nucleic acid (PNA). *Bioconjug. Chem.* **17**, 750–758
51. Shiraishi, T., Hamzavi, R., and Nielsen, P. E. (2008) Subnanomolar antisense activity of phosphonate-peptide nucleic acid (PNA) conjugates delivered by cationic lipids to HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4424–4432
52. Egholm, M., Christensen, L., Dueholm, K. L., Buchardt, O., Coull, J., and Nielsen, P. E. (1995) Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 217–222

Received for publication July 22, 2010.
Accepted for publication March 3, 2011.

Annexe 2

Flavin Conjugates for Delivery of Peptide Nucleic Acids

Fanny Marlin,^[a] Philippe Simon,^[a, b] Stéphanie Bonneau,^[c] Patrizia Alberti,^[a] Céline Cordier,^[a] Charlotte Boix,^[a] Loïc Perrouault,^[a] Aurélie Fossey,^[a] Tula Saison-Behmoaras,^[a] Marc Fontecave,^[b] and Carine Giovannangeli^{*,[a]}

Oligonucleotides and their analogues, such as peptide nucleic acids (PNAs), can be used in chemical strategies to artificially control gene expression. Inefficient cellular uptake and inappropriate cellular localization still remain obstacles in biological applications, however, especially for PNAs. Here we demonstrate that conjugation of PNAs to flavin resulted in efficient internalization into cells through an endocytic pathway. The flavin–PNAs exhibited antisense activity in the sub-micromolar range, in the context of a treatment facilitating endosomal

escape. Increased endosomal release of flavin conjugates into the cytoplasm and/or nucleus was shown by chloroquine treatment and also—when the flavin–PNA was conjugated to rhodamine, a mild photosensitizer—upon light irradiation. In conclusion, an isoalloxazine moiety can be used as a carrier and attached to a cargo biomolecule, here a PNA, for internalization and functional cytoplasmic/nuclear delivery. Our findings could be useful for further design of PNAs and other oligonucleotide analogues as potent antisense agents.

Introduction

Peptide nucleic acids (PNAs) are DNA mimics with uncharged, peptide-like backbones. PNAs have unique properties and have been objects of intense interest in the fields of biotechnology and biomedicine. PNAs hybridize to RNA and DNA sequences in sequence-specific manner with very high affinities and are very resistant to nuclease and protease degradation. Consequently, PNAs have been developed both as antisense and as antigene agents for artificial regulation of gene expression and gene editing. Antisense PNAs are particularly effective in applications aimed at modulating splicing (for a review, see ref. [1]) or, more recently, inhibiting miRNA functions.^[2]

On the other hand, PNAs do not readily diffuse through lipid membranes into the interiors of intact cells. To increase levels of cellular uptake, PNAs are often conjugated with small lipophilic molecules, and considerable work has been done with PNAs conjugated with cell-penetrating, positively charged peptides (CPPs; for a review see ref. [3]). Most PNA–CPP conjugates internalized by cells are retained in the endosome/lysosome compartments, and additional treatment is needed to induce endosomal escape.

Here we report that chemical modification of PNAs with flavins facilitates cellular uptake. Flavins are biological molecules present in cells as riboflavin (vitamin B₂), flavin adenine dinucleotide (FAD), and flavin mononucleotide (FMN); each contains a redox-active isoalloxazine group and a ribitol sugar moiety. Riboflavin is an essential nutrient that is actively absorbed by eukaryotic cells through specialized transport mechanisms that are poorly understood, although a riboflavin carrier protein (RCP) is known to be involved in receptor-mediated riboflavin internalization. Specific receptors (RiboFlavin Transporters, RFTs) have recently been identified^[4] and shown to be expressed in given tissues that absorbs flavins. Two previous studies reported the use of flavins as carriers or targeting ligands: in one case for bovine serum albumin (BSA)^[5] and in

the other for a dendrimeric nanoparticle conjugated to methotrexate.^[6] The synthesis of PNA–flavin conjugates has been described previously, and it was shown that the presence of the flavin moiety did not impair PNA affinity for complementary sequences.^[7] Here we present the results of cell penetration studies and cellular antisense activity of PNA–flavin conjugates.

Results

Synthesis of PNA–flavin conjugates and uptake properties

We carried out the solid-phase synthesis of a series of PNA conjugates tagged with a synthetic flavin (F) at their N termini (Figure 1A). The flavin (F) contains a tail with a carboxylate end for covalent attachment to the PNA through an amide bond. We also attached a tetramethylrhodamine dye—TAMRA (R)—at the C termini of the flavin–PNA conjugates (F–PNAs) through the side chain of a lysine residue to give F–PNA–R conjugates (Figure S1 in the Supporting Information). The C-terminal lysine moieties were introduced to facilitate attachment of the fluorophore.

[a] Dr. F. Marlin, Dr. P. Simon, Dr. P. Alberti, C. Cordier, C. Boix, L. Perrouault, A. Fossey, Prof. T. Saison-Behmoaras, Dr. C. Giovannangeli
Museum National d'Histoire Naturelle, CNRS, UMR7196 and Inserm, U565
43 rue Cuvier, 75005 Paris (France)
E-mail: giovanna@mhnh.fr

[b] Dr. P. Simon, Prof. M. Fontecave
Collège de France, CNRS FRE 3488
11 place Marcelin-Berthelot, 75005 Paris (France)

[c] Dr. S. Bonneau
Université Pierre et Marie Curie Paris 6, CNRS FRE 3207
4 place Jussieu, 75005 Paris (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201200505>.

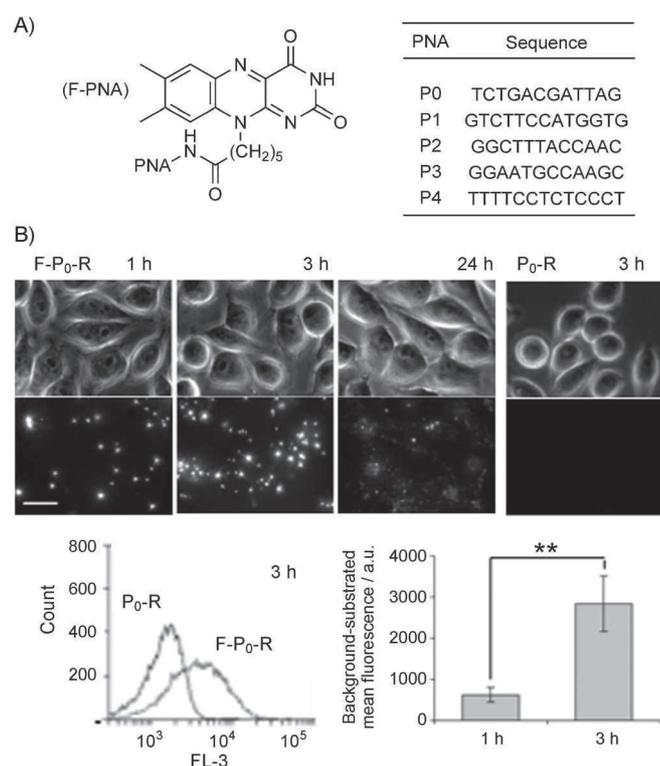


Figure 1. Flavin conjugation for PNA delivery. A) Chemical structures of PNA conjugates used in this study. Left: the flavin derivative used has a carboxylic acid chain at N10 instead of a ribityl chain as in the natural riboflavin, and this modified chain was coupled to the N-terminal ends of the PNAs (F-PNA). Right: sequences of PNAs used in this study. Sequences are written from 5'/N-term to 3'/C-term. B) Uptake and intracellular distribution of PNA-flavin conjugates. HeLa-luc cells were treated with 1.5 μM of F-P₀-R or P₀-R for 1 h or 3 h and then observed under a microscope for red fluorescence and phase contrast, either immediately or at 21 h post-treatment (24 h time point), and analyzed by flow cytometry ($n=5$; $p=0.008$). Scale bar: 20 μm .

The ability of flavin to deliver PNAs into cells was first investigated by fluorescence microscopy of live cells after treatment with F-P₀-R; flow cytometry (FACS) was used for quantification. HeLa cells were treated with 1.5 μM PNA conjugates. After 1 to 3 h of incubation at 37 °C, intense rhodamine fluorescence was observed in intracellular, mainly vesicular, structures (Figure 1B). The levels of internalized conjugates were shown by fluorescence imaging and FACS quantification to increase with time. When cells were treated for 3 h and further cultured in fresh medium for an additional 21 h (Figure 1B, 24 h time point), cellular rhodamine fluorescence was still mainly localized in vesicular structures, although the sizes of the vesicles were smaller than those observed at 3 h. In contrast, cellular uptake experiments with PNA-rhodamine conjugate (P₀-R) showed only background level signal after 3 h incubation, thus indicating that the flavin was essential for cellular internalization of PNAs. Finally, flavin-PNA conjugates without TAMRA also exhibited only background signal, as would be expected from flavin's absorbance properties (Figure S4 A).

To characterize the uptake mechanism and intracellular localization of PNA conjugates, we first investigated the energy dependence of the uptake in order to distinguish between a

direct process involving translocation across the lipid bilayer and energy-dependent mechanisms. Uptake of F-P₀-R into HeLa cells was almost abolished upon incubation at 4 °C and upon depletion of cellular ATP by sodium azide treatment (Figure S2 A). This indicates that the internalization of these PNA conjugates is in large part mediated by an energy-dependent process. We then examined the colocalization of the conjugates with labeled transferrin and dextran, well-known markers for clathrin-coated vesicle and smooth-vesicle endocytosis, respectively. At early time points (2 h) there was extensive colocalization of PNA conjugates with dextran but no colocalization with transferrin (Figure S2 B). The PNA conjugate signal partially overlapped with that of an acidotropic marker (LysoTracker Green) known to localize in lysosomes, but only at long incubation times (24 h). Taken together, these localization studies suggest that F-P₀-R conjugates are internalized by HeLa cells through the same endocytic pathway as the one which internalizes dextran: namely smooth-vesicle endocytosis, also called macropinocytosis.

Uptake studies were also carried out in Caco2, RPE1, and COS-1 cells. Caco2^[8] and RPE1^[9] cells had previously been shown to internalize riboflavin; COS-1 cells do not express RCP.^[10] After 3 h of incubation with F-P₀-R, an intracellular pattern of fluorescence similar to that observed with HeLa cells was seen for the three cell lines (Figure S3); no significant uptake of P₀-R was detected in any of the cell lines. These results demonstrate that flavins mediate cellular uptake of PNAs in various cell lines, including cells lacking the RCP as COS-1, suggesting that this protein is not essential for PNA-flavin conjugate internalization, in contrast to what has been described for flavins alone.^[10]

Endosomal escape of PNA-flavin conjugates

The PNA-flavin conjugates are almost exclusively localized in endosomal compartments even after long incubation times. Sequestration in endocytic vesicles prevents PNA access to their nucleic acid targets. We therefore evaluated the effects of chloroquine (CQ), an endosomolytic agent that alters endosomal pH, on PNA conjugate localization. CQ has been successfully used in several studies involving PNAs,^[11] especially PNA-CPP conjugates. Incubation of HeLa cells with F-P₀-R in the presence of CQ led to an increase in the sizes of the vesicles, and weak fluorescent signals were observed in the cytosol and the nuclei of some cells (Figure 2A). These observations support the possibility that endosomolytic reagents could induce endosomal release of the PNA-flavin conjugates.

A few examples have described the escape of some fluorescent peptide or protein conjugates, and recently PNA conjugates, from endosomes during fluorescence microscope analysis.^[12] We made a similar observation in the case of flavin-PNA conjugates. Cells irradiated during image stack acquisition underwent redistribution of the rhodamine signal from endosomal compartments to cytosol and nucleus. After approximately 1 min of irradiation with the 545/30 nm filter, F-P₀-R had escaped from vesicles and diffused throughout the cells and into the nucleus. This phenomenon, referred to as photochemical

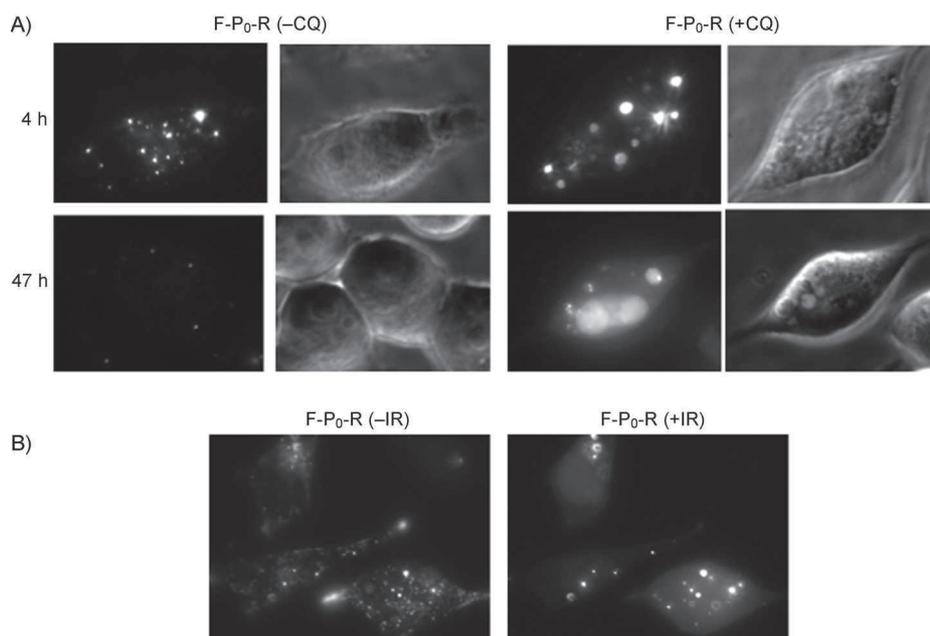


Figure 2. Redistribution of PNA–flavin conjugates after chemical or photochemical treatment. A) Intracellular redistribution of PNA–flavin conjugates after chloroquine treatment. HeLa cells were treated with $1.5 \mu\text{M}$ F-P₀-R in the presence or absence of $150 \mu\text{M}$ chloroquine (CQ) for 4 h and were then observed under the microscope as in Figure 1B, either immediately or after 43 h incubation (47 h time point; see the Experimental Section for details). B) Relocalization of the doubly conjugated flavin–PNA–rhodamine after illumination. HeLa-luc cells treated with F-P₀-R ($1.5 \mu\text{M}$ F-P₀-R for 3 h and observation 24 h post-treatment) were irradiated under the microscope at 545/30 nm and data were acquired after 40 ms [preirradiation (–IR); left] or 1 min 20 s irradiation [post-photochemical internalization (+IR); right].

internalization (PCI),^[13] is illustrated by the pre-irradiation and post-PCI fluorescence images shown in Figure 2B. The same observations were made when using Caco2 and RPE1 cell lines and different PNA conjugate sequences (data not shown). Rhodamine is an interesting dye in the context of this work because the light absorption maxima of rhodamine and flavin are well separated (Figure S4). The absorbance and fluorescence properties of rhodamine are not significantly affected by attachment either to a PNA or to a PNA–flavin. Flavin does not absorb light at 545 nm, but rhodamine does. The latter dye is therefore likely to be the photosensitizer responsible for the observed PCI.

Antisense activities of PNA–flavin conjugates

We then decided to evaluate the cellular activities of flavin–PNAs on a reporter system established in HeLa cells in which luciferase activity is controlled by a doxycycline-inducible CMV promoter and so can be easily quantified (Figure 3A). The so-called HeLa-luc cells stably contain such a firefly luciferase reporter gene (Luc).^[14]

We first identified a PNA sequence capable of inhibiting luciferase translation. To reach this goal we designed various flavin–PNAs targeted on the 5'-UTR of the luciferase RNA and evaluated their activities after streptolysin-O (SLO) cell permeabilization. This delivery procedure allowed internalization of large amounts of oligonucleotides and analogues. Two of the tested PNAs—F-P1 and F-P3—exhibited inhibitory activity,

with the anti-AUG conjugate, F-P1, being the more efficient, with 60% luciferase inhibition relative to untreated cells or cells treated with an unrelated sequence (F-P4). F-P1 and F-P3 have inhibitory activities comparable to those of unconjugated P1 and P3, respectively (Figure S5); this supports the conjecture that flavin conjugation maintains the inhibition efficiency. In order to characterize the mechanism of action we quantified luciferase RNA levels in parallel to protein expression. We did not observe any decrease in RNA levels after F-P1 treatment, in contrast to what was observed in the presence of phosphorothioate antisense oligonucleotide, used here as a positive control^[15] (data not shown). This demonstrates that inhibition takes place at the translation level and that the flavin moiety was not exhibiting redox activity that could have led to RNA cleavage of the target sequence.

In addition, fluorescent PNA–flavin conjugate F-P1-R was seen inside the cells when directly added to HeLa cells, as described above for F-P₀-R (Figure S6A). These experiments support the conjecture that the F-P1 conjugate is a good candidate for evaluation in free-uptake experiments.

Flavin conjugate F-P1 was then directly administrated in HeLa-luc cells without the help of any transfection procedure (Figure 3B). Because endocytic uptake was observed for flavin–PNA, we evaluated its biological activity in the presence of CQ. HeLa-luc cells were treated with unconjugated or flavin-conjugated PNA for 4 h in the presence or in the absence of $150 \mu\text{M}$ CQ, and luciferase expression was then induced by doxycycline addition. Luciferase activity was quantified 24 and 43 h later (Figures S6B and 3B, respectively). We found that, in the presence of CQ, luciferase activity was inhibited by the F-P1 conjugate at 24 and 43 h; dose-dependent inhibition was observed with around 50% inhibition at 375 nM, 43 h post-induction. In contrast, no significant inhibition was observed either in the absence of CQ, or for the isosequential unconjugated P1 PNA, or for a flavin–PNA with an unrelated sequence (F-P4).

We then evaluated the antisense activity of the doubly conjugated PNA, F-P1-R, which could be used in a PCI approach to induce endosomal release. Unfortunately, we found that, for unknown reasons, the presence of the rhodamine moiety had a strongly deleterious effect on the activity of the PNA. Indeed treatment of HeLa-luc cells with F-P1-R conjugate, in the presence of CQ, did not show any inhibition of luciferase activity under conditions under which F-P1 is active (Figure S7A). Con-

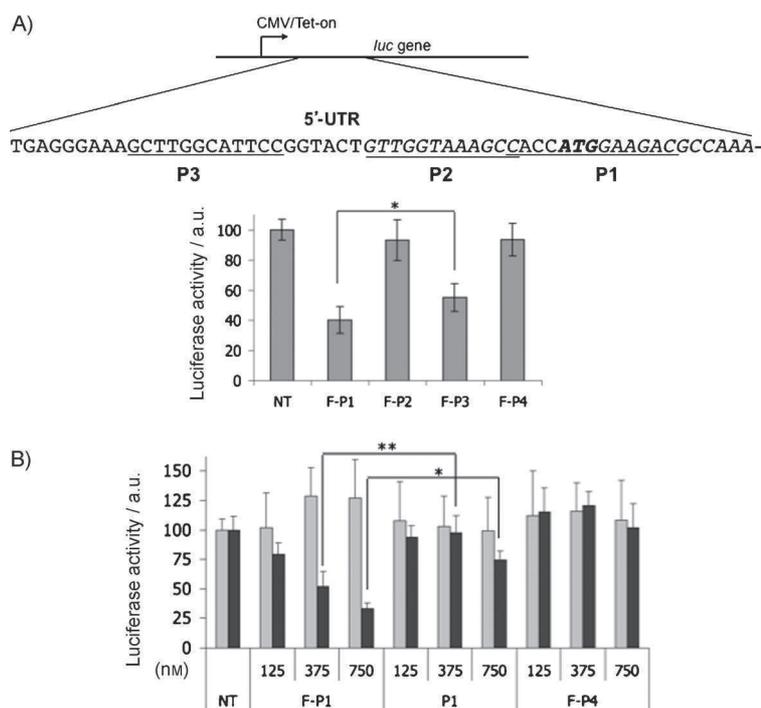


Figure 3. Cellular activities of PNA–flavin conjugates. A) Selection of an active PNA–flavin sequence in permeabilized cells. Top: the reporter system integrated in HeLa-luc cells is shown schematically; the luciferase gene is under the control of a doxycycline-inducible promoter and various PNAs have been designed to target the 5'-UTR region and the AUG start codon. Bottom: HeLa-luc cells were permeabilized by Streptolysin-O in the presence of various F-PNA conjugates (final concentrations of 1 μM; see details in Experimental Section and sequences in Figure 1B), and luciferase activity was measured 24 h after treatment ($n = 4$ to 5, $p = 0.028$). B) Cellular activity of F-PNA conjugates in the absence of transfection agents. HeLa-luc cells were incubated for 4 h with various concentrations of F-PNA conjugates or unconjugated PNAs in the presence (■) or absence (▨) of 150 μM chloroquine. Cells were then induced by doxycycline for 43 h before measurement of luciferase activity ($n = 3$ to 7, $p = 0.008$ to 0.05).

sistent with this observation, no inhibition of gene expression could be detected in the cells treated with F-P1-R after illumination at 545 nm (Figure S7A), even if under our PCI conditions we could observe endosomal escape comparable to that observed with the CQ treatment (Figures S7B and 2) and not associated with any toxicity.

In conclusion, flavin conjugation to PNAs allows efficient cellular uptake that is compatible with antisense activity at sub-micromolar concentrations, in association with a CQ treatment for facilitation of endosomal escape.

Discussion

Approaches to PNA delivery, including conjugation of PNAs with various chemical moieties, especially with CPPs, have been developed previously. Here we show that PNAs conjugated to flavin can enter cells, thereby demonstrating that an isoalloxazine ring can act as an uptake enhancer in this context. This new carrier for PNA delivery could be advantageous because it has been proposed that riboflavin allows cell-type targeting, including specific cancer-cell targeting (e.g., ref. [16]), and such a property will be interesting to explore in the con-

text of PNA delivery. In addition, production of PNA–flavin conjugates on large scales is straightforward: firstly, production of the flavin precursor has been optimized to produce large amounts,^[7] and secondly, the coupling reaction should be easily adaptable to automated synthesis procedures.

Reduced flavins are known to convert molecular oxygen into reactive oxygen species that can cause damage to intracellular compounds, including nucleic acids. Here we have shown that PNA–flavin conjugates did not cleave their RNA targets because no decrease in RNA levels was observed after PNA–flavin treatment.

For PNA–flavin conjugates, uptake involves an endocytic pathway; the vesicular localization of the conjugates was the same as for dextran, which is known to be internalized by macropinocytosis. It should be noted that endosomal trafficking processes are extremely complex and that several can work simultaneously for the uptake of one given biomolecule. Our data indicate that the mechanism of uptake of F-PNA-R differs from that of cargo-free riboflavin because RCPs do not seem to be involved. In addition, cellular internalization of PNA–flavin conjugates was not inhibited by a tenfold excess of riboflavin (data not shown). This result is consistent with observations made previously with riboflavin–albumin conjugates^[5] and riboflavin–PAMAM dendrimers^[6] and with data indicating that the endocytic uptake for a given carrier is strongly dependent on the attached cargo.

Once internalized, the PNA–flavin conjugates were retained in endosome/lysosome compartments. Recently it was shown that such localization is compatible with biological activity if miRNAs are targeted,^[2]

opening new roads for delivery approaches leading to endosome retention. However, when the biological target is present in cytoplasm or nucleus, as in the case of mRNA or pre-mRNA targeting, approaches to facilitate endosomal escape must be used, and we evaluated different representatives of these with PNA–flavin conjugates.

Chloroquine, a well-known endosomolytic agent,^[11] was very efficient in inducing release of PNA–flavin conjugates and subsequent antisense activity, with inhibitory concentrations lower than 500 nM. We also explored a PCI-based approach with a PNA–flavin conjugated to rhodamine employed as a photosensitizer. The finding of a PCI effect of rhodamine on the release of F-PNA-R conjugates from endosomes opened the exciting possibility of using such a trifunctional conjugate for control of cellular gene expression, requiring only visible light irradiation and with no need for an endosomolytic agent such as chloroquine. Porphyrin derivatives are commonly used in PCI experiments,^[17] but here rhodamine attached to the PNA–flavin conjugate also seems to be functional because we observed red fluorescence redistribution upon irradiation. It is assumed that these PCI compounds are active when they localize into endosome/lysosome membranes and produce reactive

oxygen species upon irradiation, thus weakening the membrane.^[13] The conjugation of photosensitizers to PNAs is an attractive strategy because it could help to restrict nonspecific phototoxicity by targeting the photosensitizer to PNA-containing vesicles. Our data seem to indicate that the combination of a hydrophobic isoalloxazine ring, as a cell-penetrating facilitator of PNAs, and a photosensitizer such as rhodamine allows such a weakening of the membrane and the subsequent PNA release. We also demonstrated that the doubly conjugated PNA maintained its ability to bind its complementary sequence upon irradiation (Figure S7C) and was then photochemically stable or only moderately modified. In our case, the PCI thus seems efficient, but unfortunately the rhodamine moiety impaired the PNA–flavin antisense function, for still unexplained reasons. It is likely specific to the P1 sequence, however, because PNA–rhodamine conjugates have already been shown to exhibit antisense activity (for a recent example, see ref. [12c]). Such trifunctional conjugates, F-PNA-R, require further investigation to obtain efficient antisense agents, based on the design of new conjugates in which the PCI agent and the PNA sequence are compatible for antisense activity.

Conclusions

In conclusion, the conjugates that we have designed provide a new way of enhancing the uptake of PNAs into eukaryotic cells and allowing PNAs to exhibit antisense activity. The isoalloxazine ring drives the PNA through the outer membranes into intracellular endosomes/lysosomes. Further experiments are needed to better characterize the mechanisms of flavin-dependent transport of PNAs through membranes and its cell-type targeting potential, as well as the chemical and photochemical endosomal escape processes. These studies should allow optimization of the conjugate design for improved biological activity. Finally, conjugation of flavins or analogues might also be useful for the delivery of other antisense agents.

Experimental Section

Chemical synthesis

PNA–flavin conjugates were synthesized as described previously.^[7]

Rhodamine-PNA-flavin conjugates: Disopropylethylamine (50 μL) and a solution of 5-carboxy-tetramethylrhodamine *N*-succinimidyl ester (Sigma–Aldrich, 25 μL) were added to a solution of a PNA–flavin conjugate in DMF/ H_2O (1.5 mL). After 12 h at 50 °C, the modified PNA was purified by HPLC. HPLC purification was carried out on a C_{18} reversed-phase X-bridges column (Waters, 10 \times 250 mm). Elution was performed at 60 °C at a flow rate of 2 mL min^{-1} with a gradient from aqueous TFA (0.1%) to TFA in acetonitrile (0.1%) (detection at 254, 350, 450 and 520 nm; see an example in Figure S1B). F-P₀-R MS (ESI+): m/z calcd: 4307.8; found: 4307.3. F-P₁-R MS (ESI+): m/z calcd: 4422.0; found: 4421.3. F-P₃-R MS (ESI+): m/z calcd: 4182.8; found: 4182.1.

Rhodamine-PNA: The N-terminally acetylated PNA was coupled to rhodamine as described above. P₀-R MS (ESI+): m/z calcd: 4011.8; found: 4011.2.

Cell culture: The HeLa-luc cell line used in this study was derived from HeLa/Tet-on cells (Clontech) that stably express the rTet protein necessary for the expression of doxycycline-inducible promoters. The HeLa-luc cells stably contain the firefly luciferase (*Photinus pyralis*) reporter gene (luc) under the control of a doxycycline-inducible CMV promoter.^[14]

HeLa-luc and COS-1 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) containing fetal bovine serum (FBS, 7 and 10%, v/v, respectively). RPE1 cells were cultured in DMEM/F12 (Gibco) supplemented with FBS (10%). Caco2 cells were maintained in DMEM with FBS (20%). All cell lines were grown at 37 °C under CO₂ (5%).

Cellular internalization studies

Cell uptake assay: Cells (30 000 HeLa-luc, 15 000 RPE1 or 40 000 Caco2 or COS-1 cells) were plated on an 8-well Ibidi μslide (Biovalley) in their corresponding medium (200 μL) and cultured overnight. The medium was then discarded and cells were briefly washed with phosphate-buffered saline (PBS, Gibco) and incubated with PNA conjugates (1.5 μM) in OptiMEM (Gibco) for 1 h to 3 h at 37 °C. For the 24 h time point, the medium was discarded after 3 h treatment, and cells were washed with PBS and further incubated in fresh appropriate culture medium for 21 h at 37 °C.

Fluorescence microscopy and flow cytometry: For live cell imaging, incubation medium was discarded, and Hank's balanced salt solution (HBSS, 200 μL) was added to cells just before observation with a Leica DMIRE2 fluorescence microscope fitted with a red filter ($\lambda_{\text{ex}} = 545/30$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 610/75$ nm). Cells were viewed with a Leica 100 \times oil immersion objective with a numerical aperture of 1.40 fitted with a CoolSNAP HQ monochrome cooled CDD camera (Photometrics–Roper Scientific). Images were captured by use of Metamorph software and analyzed with Image J. Presented images are z projections of 36 images stacked (0.2 μm between images). To evaluate cell viability, cells were stained with SytoxGreen (Invitrogen) and/or observed by phase-contrast imaging. Under all the conditions used in this work cell viability was above 90%. Representative images of at least three independent experiments are shown and phase-contrast images are presented above fluorescence images.

Alternatively, cells were trypsinized (Gibco), rinsed twice with PBS, and analyzed with a C6 flow cytometer (Accuri) by using the Cy5 channel (FL3), for quantification of cellular uptake of rhodamine-labeled molecules. Mean fluorescence obtained for F-PNA-R, reduced by that obtained for PNA-R (used as a control) is reported (background-subtracted mean fluorescence).

Cellular activity

Permeabilization by streptolysin-O (SLO): HeLa-luc cells were trypsinized and washed twice in HBSS lacking Mg²⁺ and Ca²⁺ (GIBCO) and then resuspended at a concentration of 13×10^6 cells mL^{-1} in HBSS. This solution (20 μL) was permeabilized with an optimized amount of SLO (a gift from S. Bakhdi, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany) in the presence of PNAs or PNA conjugates (10 μM) for 15 min at 37 °C. The permeabilization was then stopped by adding DMEM (180 μL) containing CaCl₂ (1.8 mM) and FBS (7%, tenfold dilution and final PNA concentration equal to 1 μM). After 30 min incubation at 37 °C for resealing, cells were dispatched in triplicate in a 96-well plate (40 000 cells per well) and induced with doxycycline for 24 h.

Free-uptake internalization: Approximately 8500 HeLa-luc cells were plated on a 96-well plate in DMEM (100 μL) + SVF (7%) and cul-

tured overnight. The medium was then discarded and cells were washed with PBS and incubated with PNAs or PNA conjugates (0.5, 1.5, or 3 μM) either in the presence or in the absence of chloroquine (Sigma, 150 μM) in OptiMEM (50 μL) for 4 h at 37 °C. DMEM (150 μL) with SVF (7%) was then added (fourfold dilution of PNA in the final cell culture) and cells were incubated for either 24 h or 43 h at 37 °C before luciferase expression analysis. For PCI experiments in the presence of rhodamine conjugates, cells were washed after 15 h incubation and reincubated with fresh medium for 2 h before illumination at 545 nm (see below for details); cells were then induced with doxycycline and luciferase expression was analyzed 24 h later.

Analysis of *Photinus pyralis* (luciferase) expression: HeLa-luc cells were washed with PBS and lysed with Passive Lysis Buffer (Promega, 60 μL per well) for 30 min. Lysates (25 μL) were transferred to a white polystyrene 96-well (Corning) and luciferase luminescence was measured with the Luciferase Assay System (Promega) and a Victor² luminometer (Wallac). MDoxycycline (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma) induction was performed, either just after permeabilization in SLO experiments for 24 h, or after the 4 h PNA incubation for 43 h (or 24 h) in the free-uptake protocol, or after cell illumination for 24 h in the PCI protocol. The luminescence data were then normalized by microgram of proteins after protein quantification by the Bradford Protein Assay (Biorad).

Acknowledgements

The authors thank Lionel Dubost and Arul Marie for mass spectrometry analysis. F.M. was supported by the French Ministry for Research. This work was supported by ANR, CNRS, INSERM, and MNHN.

Keywords: antisense agents • drug delivery • oligonucleotide conjugates • peptide nucleic acids • photochemical internalization • riboflavin

- [1] J. Bauman, N. Jearawiriyapaisarn, R. Kole, *Oligonucleotides* **2009**, *19*, 1–13.
- [2] A. G. Torres, M. M. Fabani, E. Vigorito, D. Williams, N. Al-Obaidi, F. Wojciechowski, R. H. Hudson, O. Seitz, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 2152–2167.
- [3] B. Lebleu, H. M. Moulton, R. Abes, G. D. Ivanova, S. Abes, D. A. Stein, P. L. Iversen, A. A. Arzumanov, M. J. Gait, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 517–529.
- [4] Y. Moriyama, *J. Biochem.* **2011**, *150*, 341–343.
- [5] S. R. Holladay, Z. Yang, M. D. Kennedy, C. P. Leamon, R. J. Lee, M. Jayamani, T. Mason, P. S. Low, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1999**, *1426*, 195–204.
- [6] T. P. Thomas, S. K. Choi, M. H. Li, A. Kotlyar, J. R. Baker, Jr., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5191–5194.
- [7] P. Simon, J. L. Decout, M. Fontecave, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7013–7015; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6859–6861.
- [8] H. M. Said, T. Y. Ma, *Am. J. Physiol.* **1994**, *266*, G15–G21.
- [9] H. M. Said, S. Wang, T. Y. Ma, *J. Physiol.* **2005**, *566*, 369–377.
- [10] C. W. Mason, V. M. D'Souza, L. M. Bareford, M. A. Phelps, A. Ray, P. W. Swaan, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 465–472.
- [11] a) T. Shiraishi, S. Pankratova, P. E. Nielsen, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 923–929; b) J. J. Turner, G. D. Ivanova, B. Verbeure, D. Williams, A. A. Arzumanov, S. Abes, B. Lebleu, M. J. Gait, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6837–6849.
- [12] a) J. R. Maiolo III, E. A. Ottinger, M. Ferrer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15376–15377; b) M. P. Gillmeister, M. J. Betenbaugh, P. S. Fishman, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 556–566; c) S. L. Boe, A. S. Longva, E. Hovig, *Nucleic Acid Ther.* **2011**, *21*, 359–367.
- [13] K. Berg, M. Folini, L. Prasmickaite, P. K. Selbo, A. Bonsted, B. O. Engesaeter, N. Zaffaroni, A. Weyergang, A. Dietze, G. M. Maelandsmo, E. Wagner, O. J. Norum, A. Hogset, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2007**, *8*, 362–372.
- [14] E. Brunet, M. Corgnali, F. Cannata, L. Perrouault, C. Giovannangeli, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 4546–4553.
- [15] M. Faria, D. G. Spiller, C. Dubertret, J. S. Nelson, M. R. White, D. Scherman, C. Helene, C. Giovannangeli, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 40–44.
- [16] T. Johnson, A. Ouhtit, R. Gaur, A. Fernando, P. Schwarzenberger, J. Su, M. F. Ismail, H. I. El-Sayyad, A. Karande, Z. A. Elmageed, P. Rao, M. Raj, *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 3634–3640.
- [17] T. Shiraishi, P. E. Nielsen, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1451–1456.

Received: August 4, 2012

Published online on November 5, 2012