

L'ARN molécule thérapeutique ? Vers une conception rationnelle du développement des ARN antisens, des ribozymes et des aptamères d'ARN

Édouard Bertrand, Carole Gwizdek, David Fenard, Alain Doglio

Les progrès accomplis dans le domaine de la vectorisation et du transfert de matériel génétique dans les cellules de mammifères ouvrent de nouvelles perspectives en matière de thérapie génique. On envisage, en particulier, d'utiliser

les produits du gène – ARN ou protéines – pour promouvoir, dans la cellule, des activités thérapeutiques capables de contrôler sélectivement l'expression de phénotypes pathogènes.

Le recours à la molécule d'ARN présente de nombreux avantages et suscite un intérêt croissant. Dans la cellule, l'ARN est un acteur moléculaire incontournable, naturellement impliqué dans le fonctionnement et la régulation de toutes les voies métaboliques. Ce rôle pivot est la conséquence de propriétés moléculaires remarquables qui permettent à l'ARN de transporter de l'information génétique, d'interagir avec des partenaires moléculaires variés et de catalyser de nombreuses réactions enzymatiques. Les approches thérapeutiques fondées sur l'expression intracellulaire d'ARN sélectionnés pourraient faciliter à terme le traitement de diverses maladies d'origine virale comme le SIDA [1-4], ou génétique [5-7]. Dans ce contexte, l'utilisation d'ARN thérapeutiques offre au moins deux avantages : une faible toxicité et surtout une absence d'immunogénicité. Ce dernier point est particulièrement important si l'on considère que le rejet, par le système immunitaire,

des cellules qui expriment des épitopes du non-soi représente un des principaux obstacles au développement des approches fondées sur l'expression de protéines hétérologues.

Les ARN antisens, les ribozymes, et les aptamères d'ARN

C'est en 1984 que Izant et Weintraub [8] ont, pour la première fois, montré que la production intracellulaire d'un ARN antisens permettait de contrôler négativement l'expression d'un gène cellulaire (gène de la thymidine kinase). Depuis lors, l'émergence de nouveaux concepts et l'évolution des techniques ont conduit à diversifier les approches et à rendre chacune plus spécifique. Il est désormais traditionnel de classer les ARN inhibiteurs en trois classes : les ARN antisens, les ribozymes et les aptamères (figure 1).

Les ARN antisens [9-11] contiennent une séquence nucléotidique complémentaire de celle de l'ARN messager

dont on souhaite bloquer l'expression. La formation intracellulaire d'un hybride entre l'ARNm naturel et la séquence antisens bloque la traduction de l'ARN et provoque la diminution de la protéine correspondante. Les ribozymes, ou ARN catalytiques, sont capables de s'apparier avec l'ARN naturel cible, mais ils sont en plus dotés d'une activité hydrolase qui leur permet de cliver cet ARN (*m/s* 1985, n° 2, p. 107; 1986, n° 5, p. 280; 1988, n° 8, p. 522; 1990, n° 6, p. 588) [12, 13]. Cette activité est portée par une courte séquence consensus, souvent dérivée des ribozymes *hammerhead* et *hairpin* [14-17]. Les ribozymes présentent l'avantage sur les ARN antisens de fonctionner suivant un mode catalytique et d'inactiver définitivement la cible. Dans ces deux approches, la séquence de l'ARN thérapeutique est prédéfinie. Au contraire, les « aptamères ARN » sont engendrés à partir d'une banque aléatoire ADN d'oligonucléotides, convertis en séquences ARN, capables de se fixer avec une forte affinité sur des substrats aussi variés

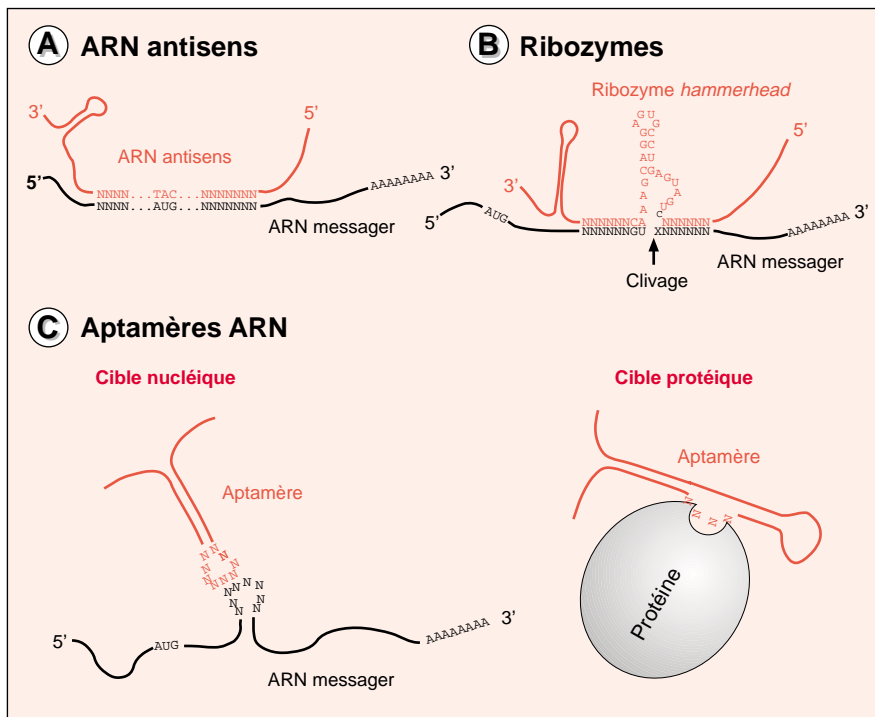


Figure 1. **Principe de fonctionnement des différents ARN inhibiteurs.** Dans le cas des ARN antisens et des ribozymes, la reconnaissance spécifique de la cible (ARN messager) résulte essentiellement de la mise en place d'interactions de type Watson-Crick sur des longueurs variables. La formation de ces hybrides dépend très directement de l'accessibilité de chaque séquence et donc de la structure des ARN. En particulier, le fonctionnement catalytique des ribozymes hammerhead (figuré ici) ou hairpin nécessite que le ribozyme soit soumis à de faibles contraintes afin de pouvoir adopter une conformation qui soit compatible avec son activité. Dans le cas des aptamères, les interactions mises en jeu sont complexes et impliquent la reconnaissance entre des motifs structuraux. Les aptamères sont capables de se fixer à des cibles variées qui peuvent être de nature protéique, nucléique ou autre.

que des antibiotiques, des acides aminés, des protéines, des ADN ou d'autres ARN [18, 19]. Le processus de sélection de ces aptamères comporte une succession d'étapes itératives d'amplification et de sélection selon les critères choisis, qui, appliquées à une population quasi infinie d'ARN aléatoires, permet d'enrichir progressivement cette population en séquences présentant de l'affinité pour une cible (technique SELEX, *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*). L'obtention finale d'une ou de quelques séquences gagnantes permet d'identifier des motifs ARN qui présentent une bonne affinité pour la cible et, de ce fait, un intérêt pharmacologique potentiel.

Production intracellulaire d'ARN artificiels: choix du promoteur et définition de la cassette d'expression

L'expression intracellulaire d'ARN, qu'il soit de type antisens, ribozyme ou aptamère impose que la séquence « active » soit intégrée dans une cassette d'expression. La transcription de cette cassette par les ARN polymérases cellulaires va produire un transcrite chimérique comprenant, d'une part, le domaine actif et, d'autre part, les éléments nécessaires à son expression. Le produit final définit une nouvelle entité dont le comportement moléculaire dans la cellule

reste assez difficile à prévoir. La conception et le développement de la cassette nécessite donc une attention toute particulière.

L'utilisation de l'ARN polymérase II (Pol II) permet le développement de cassettes dont l'organisation est analogue à celle des gènes codant pour les ARNm cellulaires (figure 2). Ce type de cassette permet d'assurer la production d'ARN antisens ou de ribozymes dont le métabolisme est assez proche de celui de leur cible (ARNm). Il en résulte une co-localisation des deux ARN, cible et thérapeutique, dans un même site – complexes d'épissage, voies d'export, réticulum endoplasmique – ce qui peut ainsi potentialiser l'efficacité du système [20]. Cependant, les résultats obtenus sont assez variables en termes d'efficacité. Les ARN chimériques produits sont généralement assez longs, ce qui explique que leur structure soit mal définie et rarement adaptée au fonctionnement moléculaire de la séquence active.

L'utilisation de séquences d'ADN produisant des transcrits d'ARN courts et bien structurés comme les ARN de transfert (ARNt), les petits ARN nucléaires (ARNsn U1 ou U6), ou l'ARN VA1 des adénovirus, peut pallier ce défaut, et représente de ce fait une alternative intéressante [20, 21]. L'organisation de ces cassettes est assez simple (figure 2), et se caractérise par la présence d'un promoteur fort qui peut être reconnu par l'ARN polymérase II (ARNsn U1) ou III (ARNsn U6, ARNt et ARN VA1). Les promoteurs de ces gènes sont constitués de courts éléments consensus, que l'on peut retrouver en position extragénique (U1 et U6), ou intragénique (VA1 et ARNt) [22], ce qui facilite la conception de cassettes compactes (pour quelques exemples récents, voir [3, 23-27]). Comme les systèmes de transcription acellulaire permettent la production de grandes quantités d'ARN à partir de ces cassettes, on peut étudier les propriétés moléculaires de ces ARN *in vitro*, qu'il s'agisse de la mesure de leur affinité pour un substrat (antisens, aptamères), ou de leur activité catalytique (ribozymes). L'utilisation de ce type de cassette s'est largement répandue et la plupart des travaux

Organisation génétique	Polymérase	Principales caractéristiques
<p>1 Type ARN messager</p> <p>promoteur intron séquence active polyA</p>	Pol. II	<ul style="list-style-type: none"> - ARN analogues aux ARNm (coiffés, polyadénylés, épissés) - Structure secondaire mal définie - transcription réglable
<p>2 Type U1ARNsn</p> <p>promoteur U1 séquence active signal d'arrêt U1</p>	Pol. II	<ul style="list-style-type: none"> - ARN courts (coiffés non polyadénylés) - localisation nucléaire - signal d'arrêt spécifique
<p>3 Type U6ARNsn</p> <p>promoteur U6 séquence active épingle stabilisatrice TTTT signal d'arrêt</p>	Pol. III	<ul style="list-style-type: none"> - ARN qui peut être totalement artificiel - ARN nucléaire ou cytoplasmique en fonction de la structure - signal d'arrêt spécifique
<p>4 Type ARNt ou VA1 ARN</p> <p>A B séquence active TTTT signal d'arrêt</p> <p>promoteur</p>	Pol. III	<ul style="list-style-type: none"> - promoteur fort intragénique - ARN nucléaire (ARNt) ou cytoplasmique (VA1 ARN) - signal d'arrêt spécifique

Figure 2. **Organisation génétique de différentes cassettes d'expression.** L'expression de la séquence active (antisens, ribozymes, aptamères) implique que celle-ci soit incluse dans une cassette d'expression. Les différents systèmes génétiques présentés ici (d'après [20]) sont transcrits par l'ARN polymérase II (pol II) ou l'ARN polymérase III (pol III). Les cassettes transcrivant un ARN messager autorisent l'utilisation de promoteurs dont l'activité est réglée (selon le tissu, la phase du cycle cellulaire, les facteurs de croissance...). De plus, la présence de signaux caractéristiques des ARN messagers (coiffe, intron, queue polyadénylée) oriente l'ARN produit dans une voie métabolique qui est analogue à celle de sa cible. Les gènes transcrits par la pol III sont courts et présentent une organisation génétique assez simple. De courtes régions consensus définissent le promoteur (intragénique ou extragénique) et la succession de quatre thymidines suffit à arrêter la transcription. À partir de ces éléments, il est possible de composer des cassettes d'expression assez diverses contenant une ou plusieurs séquences actives et des éléments impliqués dans la stabilité (épingle) ou responsables de la localisation intracellulaire de l'ARN.

actuels sont élaborés autour du concept d'ARN court dont la structure peut être optimisée en fonction de l'activité attendue.

Métabolisme intracellulaire des ARN artificiels

L'activité des ARN inhibiteurs requiert non seulement que la séquence active soit fonctionnelle lorsqu'elle est intégrée dans l'ARN navette, mais également que cet ARN chimérique soit fortement exprimé, et surtout correctement localisé dans les compartiments cellulaires. Ce dernier paramètre est particulièrement critique. Une première illustration est fournie par l'étude des rétrovirus : au

cours du processus d'encapsulation, les ARN génomiques ont la propriété de former des dimères. Bruce Sullenger et Tom Cech [28] ont mis à profit cette propriété et montré que l'activité d'un ribozyme était considérablement accrue s'il y avait encapsulation simultanée des deux ARN rétroviraux hétérologues, l'un contenant le ribozyme et l'autre sa cible. La co-localisation d'un ribozyme et de sa cible peut aussi être obtenue grâce à des navettes du type ARNsno, qui sont de petits ARN nucléolaires [29]. Cette stratégie permet la co-localisation du ribozyme et de sa cible dans le nucléole, et permet au ribozyme d'être extrêmement actif.

Il est important de noter que le comportement intracellulaire d'ARN chi-

mériques, qui sont par nature des ARN non physiologiques, est parfois inattendu. Dans un travail publié récemment [25], nous avons montré que l'expression de l'ARN VA1 est fortement perturbée par l'addition d'un ribozyme à son extrémité 3' (figure 3). Il en résulte un transcrite chimérique tronqué, instable et qui présente une localisation intracellulaire anormale. En revanche, lorsque le même ribozyme est inséré dans le domaine central de l'ARN VA1, il ne perturbe pas son expression. Cette différence de comportement, selon le site d'insertion du ribozyme, s'explique par le fait que l'hélice terminale de l'ARN VA1, formée par l'appariement entre les extrémités 5' et 3', est responsable de l'export

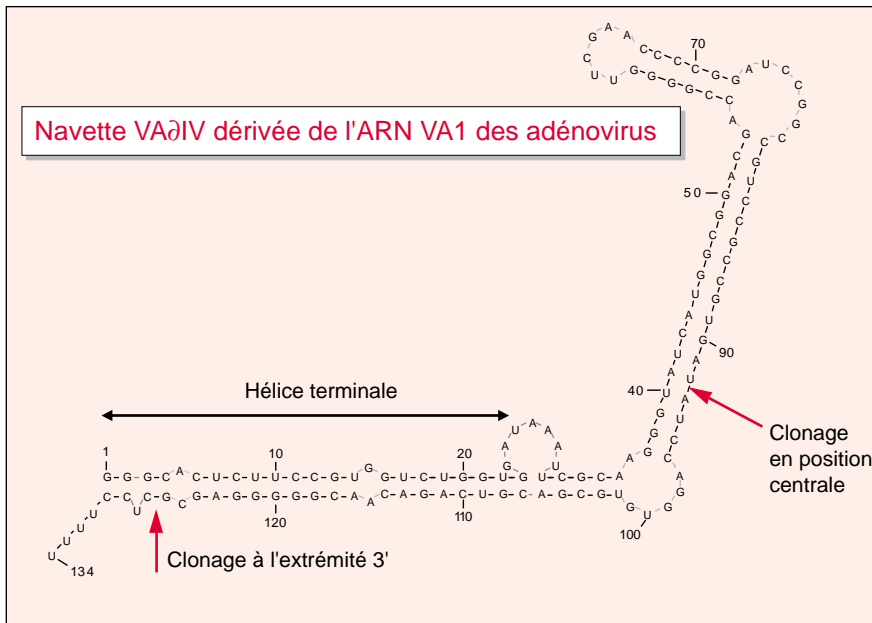


Figure 3. **Insertion de séquences actives dans la cassette d'expression VA1.** Le gène VA1 des adénovirus est transcrit par l'ARN polymérase III pour donner naissance à un ARN court (160 nt) très structuré. Afin d'échapper à l'activité physiologique de l'ARN VA1 (interaction avec la protéine-kinase R, PKR), nous avons délété le domaine central du gène VA1 pour engendrer la cassette d'expression VA Δ IV [25]. La figure représente la structure secondaire de l'ARN navette VA Δ IV (134 nt) ainsi que les différents sites permettant le clonage de séquences exogènes. Le clonage d'un ribozyme à l'extrémité 3' perturbe l'hélice terminale de l'ARN chimérique et affecte profondément son métabolisme [25]. Seule l'insertion de séquences exogènes en position centrale permet de produire de façon abondante des ARN chimériques qui soient stables et localisés dans le cytoplasme.

nucléaire de cet ARN [30]. L'ajout d'une séquence exogène, comme un ribozyme, positionné à l'extrémité 3', perturbe la fonction de l'hélice et modifie profondément le métabolisme de la navette VA1. Ces résultats illustrent la difficulté de conception des ARN artificiels et expliquent sans doute de nombreux échecs dans le domaine.

L'avenir : savoir utiliser les protéines pour faire fonctionner les ARN

La conception simpliste d'un ARN linéaire diffusant librement dans la cellule est aujourd'hui largement dépassée. En réalité, l'ARN s'associe à des protéines cellulaires pour former une ribonucléoparticule. Ces partenaires naturels influencent non seulement la stabilité et la localisation intracellulaire de l'ARN, mais aussi son activité moléculaire. Il a par

exemple été montré que la présence de protéines liant l'ARN, comme la hnRNP A1 ou la protéine de la nucléocapside du VIH, pouvait modifier *in vitro* l'activité catalytique de différents ribozymes [31]. L'utilisation de navettes présentant des propriétés moléculaires bien définies est donc critique.

Une des solutions consiste à utiliser les protéines cellulaires qui, en se fixant spécifiquement sur l'ARN navette, vont le stabiliser, le diriger vers un compartiment cellulaire précis et en potentialiser l'activité. Dans cette perspective, la connaissance des signaux capables de régler *in cis* le métabolisme des ARN représente certainement une clé pour l'avenir. Outre les exemples déjà cités, qui utilisent les séquences d'encapsulation des ARN rétroviraux, ou le motif fonctionnel des ARNsno, plusieurs travaux mettent à profit les propriétés naturelles des ARNsno U1, U2 ou U6,

afin de produire des navettes dont les caractéristiques sont connues, ce qui permet d'en prévoir le comportement cellulaire et moléculaire [3, 23, 24]. De même, la caractérisation des signaux assurant *in cis* l'export des ARN vers le cytoplasme, comme le CTE et le RRE [32], ou l'hélice terminale de l'ARN VA1 [30], pourrait permettre de faciliter la diffusion intracellulaire des ARN inhibiteurs. A ce titre, le développement d'ARN plurifonctionnels, porteurs de plusieurs séquences actives capables à la fois de diriger l'ARN vers sa cible et d'en augmenter l'activité, devrait permettre d'aboutir à des résultats de plus en plus satisfaisants.

Conclusions

Il est clair que des progrès notables ont été accomplis en matière de développement de cassettes adaptées à l'expression d'ARN artificiels. Les vecteurs sont développés avec l'objectif d'une meilleure maîtrise du fonctionnement des ARN antisens, des ribozymes et des aptamères dans le milieu cellulaire. Les applications sont larges, depuis les tests menés *in vitro* sur des systèmes cellulaires jusqu'aux applications de thérapie génique. Des essais cliniques de phase I sont actuellement en cours aux États-Unis afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité de ribozymes anti-HIV chez des patients infectés par le virus [1, 33]. Parallèlement, de nouveaux concepts apparaissent et pourraient enrichir la palette des outils déjà disponibles, comme celui des ribozymes activateurs [34, 35] capables de réparer les ARNm non fonctionnels parce que porteurs de mutations génétiques. Ces considérations laissent présager une généralisation de l'utilisation des ARN inhibiteurs et probablement de nombreuses applications dans le cadre du développement des approches de thérapie génique ■

Remerciements

Nous tenons à remercier Sylvie Barcellini-Couget et Jean-Claude Lefebvre pour leur participation à ce travail. Les auteurs remercient également l'ANRS pour son soutien financier.

Edouard Bertrand

Chargé de recherche au Cnrs, Institut de génétique moléculaire de Montpellier, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

Carole Gwizdek

Chercheuse postdoctorale, Laboratoire de virologie, Nice, France.

David Fenard

Étudiant en doctorat, Laboratoire de virologie, Nice, France.

Alain Doglio

Maître de conférences des universités, praticien hospitalier, Laboratoire de virologie, Faculté de médecine, avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France.
e-mail: doglio@unice.fr

RÉFÉRENCES

1. Wong-Staal F, Poeschla EM, Looney DJ. A controlled phase I clinical trial to evaluate the safety and effects in HIV-1 infected humans of autologous lymphocytes transduced with a ribozyme that cleaves HIV-1 RNA. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2407-25.

2. James W. The use of ribozymes in gene therapy approaches to AIDS. *Cancer Res* 1998; 144: 139-46.

3. Michienzi A, Conti L, Varano B, Prislei S, Gessani S, Bozzoni I. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by nuclear chimeric anti-HIV ribozymes in a human T lymphoblastoid cell line. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 621-8.

4. Veres G, Junker U, Baker J, et al. Comparative analyses of intracellularly expressed antisense RNAs as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 1998; 72: 1894-901.

5. Lewin AS, Dresner KA, Hauswirth WW, et al. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med* 1998; 4: 967-71.

6. Sacco MG, Barbieri O, Piccini D, et al. *In vitro* and *in vivo* antisense-mediated growth inhibition of a mammary adenocarcinoma from MMTV-neu transgenic mice. *Gene Ther* 1998; 5: 388-93.

7. Steiner MS, Anthony CT, Lu Y, Holt JT. Antisense c-myc retroviral vector suppresses

established human prostate cancer. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 747-55.

8. Izant JG, Weintraub H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 1984; 36: 1007-15.

9. Hélène C, Saison-Behmoaras E. La stratégie antisens: nouvelles approches thérapeutiques. *Med Sci* 1994; 10: 253-73.

10. Sczakiel G. The design of antisense RNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997; 7: 439-44.

11. Kumar M, Carmichael GG. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1415-34.

12. Tanner N. Ribozymes: caractéristiques et applications. *Virologie* 1998; 2: 127-37.

13. Jaeger L. The new world of ribozymes. *Curr Opin Struct Biol* 1997; 7: 324-35.

14. Earnshaw DJ, Gait MJ. Progress toward the structure and therapeutic use of the hairpin ribozyme. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997; 7: 403-11.

15. Bramlage B, Luzi E, Eckstein F. Designing ribozymes for the inhibition of gene expression. *Trends Biotechnol* 1998; 16: 434-8.

16. Welch PJ, Barber JR, Wong-Staal F. Expression of ribozymes in gene transfer systems to modulate target RNA levels. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9: 486-96.

17. Phylactou LA, Kilpatrick MW, Wood MJ. Ribozymes as therapeutic tools for genetic disease. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1649-53.

18. Gold L. The SELEX process: a surprising source of therapeutic and diagnostic compounds. *Harvey Lect* 1995; 91: 47-57.

19. Toulme JJ, Giegé R. Les aptamères: des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection *in vitro*. *Med Sci* 1998; 14: 155-66.

20. Bertrand E, Castanotto D, Zhou C, et al. The expression cassette determines the functional activity of ribozymes in mammalian cells by controlling their intracellular localization. *RNA* 1997; 3: 75-88.

21. Good PD, Krikos AJ, Li SX, et al. Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene Ther* 1997; 4: 45-54.

22. Goodrich JA, Tjian R. TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 403-9.

23. Du Z, Ricordi C, Inverardi L, Podack E, Pastori RL. Efficient *ex vivo* inhibition of perforin and Fas ligand expression by chimeric tRNA-hammerhead ribozymes. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1551-60.

24. Westaway SK, Cagnon L, Chang Z, et al. Virion encapsidation of tRNA(3Lys)-ribo-

zyme chimeric RNAs inhibits HIV infection. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1998; 8: 185-97.

25. Barcellini-Couget S, Fenard D, Bertrand E, Singer RH, Lefebvre JC, Doglio A. 3'-End modification of the adenoviral VAI gene affects its expression in human cells: consequences for the design of chimeric VAI RNA ribozymes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1998; 8: 379-90.

26. Gorman L, Suter D, Emerick V, Schumperli D, Kole R. Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4929-34.

27. Koseki S, Tanabe T, Tani K, et al. Factors governing the activity *in vivo* of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. *J Virol* 1999; 73: 1868-77.

28. Sullenger BA, Cech TR. Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* 1993; 262: 1566-9.

29. Ni J, Samarsky DA, Liu B, Ferbeyre G, Cedergren R, Fournier MJ. SnoRNAs as tools for RNA cleavage and modification. *Nucleic Acids Symp Ser* 1997; 1997: 61-3.

30. Bertrand E, Gwizdek C, Lefebvre JC, Blanchard J, Singer R, Doglio A. Terminal stem: a highly degenerate motif that directs pol III transcripts into a new and conserved export pathway. *Revue* 1999 (sous presse).

31. Bertrand E, Rossi JJ. Facilitation of hammerhead ribozyme catalysis by the nucleocapsid protein of HIV-1 and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *EMBO J* 1994; 13: 2904-12.

32. Izaurralde E, Adam S. Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *RNA* 1998; 4: 351-64.

33. Brower V, Chahine K, Dorey E, et al. All clear for HIV-targeting ribozyme in phase II. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 123.

34. Lan N, Howrey RP, Lee SW, Smith CA, Sullenger BA. Ribozyme-mediated repair of sickle beta-globin mRNAs in erythrocyte precursors. *Science* 1998; 280: 1593-6.

35. Rossi JJ. Ribozymes to the rescue: repairing genetically defective mRNAs. *Trends Genet* 1998; 14: 295-8.

TIRÉS À PART

A. Doglio.