

La chirurgie du gène par des oligonucléotides modifiés

L'utilisation d'oligonucléotides chimères ARN/ADN formant une structure en double brin ou d'oligonucléotides simple brin modifiés, pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pour les développements de la thérapie génique et de la génomique fonctionnelle. Des données récentes révèlent en effet que ces oligonucléotides ont la capacité, non seulement in vitro mais aussi

in vivo, de corriger de façon ciblée une mutation ponctuelle sur un gène donné. L'essor de cette approche dépendra de la capacité à maîtriser de façon précise l'utilisation de ces oligonucléotides, mais aussi de la compréhension des mécanismes moléculaires en jeu, notamment l'implication des processus de recombinaison et de réparation.

L'objectif ultime du généticien qui, depuis plus de vingt ans, diagnostique les maladies génétiques, serait de pouvoir « réparer » de façon sélective ces anomalies géniques. Une telle chirurgie réparatrice du gène pourrait, dans le cas des mutations ponctuelles, naître de l'application des oligonucléotides chimères ARN/ADN. Leur étonnante capacité à modifier le génome *in vivo* a été confirmée par deux études récentes [1, 2]. C'est donc l'occasion de faire le point sur cette méthode, sur ses applications et sur les interrogations qui demeurent à propos des mécanismes moléculaires impliqués. Les oligonucléotides chimères ARN/ADN comportent 44 à 50 nucléotides qui se replient sur eux-mêmes pour former une structure en double-brin avec, à ses deux extrémités, une petite boucle formée de quatre résidus T (figure 1). Leur caractéristique principale est qu'une partie de l'oligonucléotide est de l'ADN, tandis que l'autre est de l'ARN interrompu par un court segment d'ADN dont la séquence contient le nucléotide cible que l'on veut corriger. En dehors de ce nucléotide, la séquence de l'oligonucléotide chimère est strictement identique à la région de l'ADN à corriger. La présence d'ARN dans cette molécule était justifiée par la démonstration d'un meilleur appariement sur la séquence cible avec un brin de chimie ARN plutôt qu'ADN en présence de la protéine

bactérienne recA [3]. C'est en 1996, que l'équipe de Kmiec montra pour la première fois que des oligonucléotides chimères pouvaient corriger *in vitro* une mutation ponctuelle tout d'abord sur de l'ADN plasmidique (mutation d'une phosphatase alcaline) transfecté dans des cellules de hamster CHO, puis sur de l'ADN génomique (mutation du 6^e codon de la β -globine, responsable de la drépanocytose) de lymphocytes B transformés par le virus d'Epstein Barr en culture [4, 5]. L'efficacité de correction de la mutation inactivatrice fut tellement impressionnante (de 10 à 30%) que l'on parla d'oligonucléotide « magique » (*m/s*, 1996, n° 5, p. 652 et n° 12, p. 1443). Cependant, le scepticisme fut aussi de rigueur, de nombreux groupes n'ayant pas réussi à obtenir des taux significatifs de correction par cette technique, que ce soit sur leurs gènes d'intérêt ou sur les gènes déjà testés [6].

Cinq ans plus tard, la liste des succès expérimentaux des oligonucléotides chimères ARN/ADN s'est toutefois allongée, avec en particulier la démonstration de leur efficacité *in vivo* pour modifier des gènes dans différents tissus (Tableau I). Ces études visaient soit à introduire une mutation sur un gène normal, soit à corriger une mutation dans des modèles animaux de maladies génétiques. Un de ces succès le plus frappant est probablement celui de BT Kren *et al.* qui sont parvenus à cibler la mutation de

gènes dans le foie en administrant par voie intraveineuse des oligonucléotides chimères complexés à un polycation, le polyéthylénimine (PET) lactosylé, qui se fixe de façon spécifique sur le récepteur de l'asialoglycoprotéine exprimé exclusivement par les hépatocytes. Dans une première étude, les auteurs ont induit une mutation dans le gène codant pour le facteur IX [7]. L'efficacité est ici remarquable, puisqu'on observe jusqu'à 40% de conversion associée sur le plan fonctionnel à une diminution de moitié de l'activité coagulante du facteur IX. Leur seconde cible est le gène de l'UDP-glucuronosyltransférase 1A (UGT1A1) dans un modèle murin de maladie de Crigler-Najjar. Il ne s'agit pas, dans ce cas, d'une mutation ponctuelle, mais d'une délétion d'une paire de bases qui conduit à une perte d'activité enzymatique avec un défaut du métabolisme hépatique de la bilirubine [8]. La correction génique est, ici, observée dans 20% des hépatocytes, et est associée à une amélioration du phénotype de façon prolongée sur les six mois d'étude. Un autre exemple est celui du gène de la tyrosinase, enzyme impliquée dans la synthèse de mélanine, dont les mutations sont responsables d'albinisme. L'administration locale des oligonucléotides chimères provoque une correction de la mutation dans 20% des mélanocytes, qui se révèle stable trois mois après la dernière administration [9].

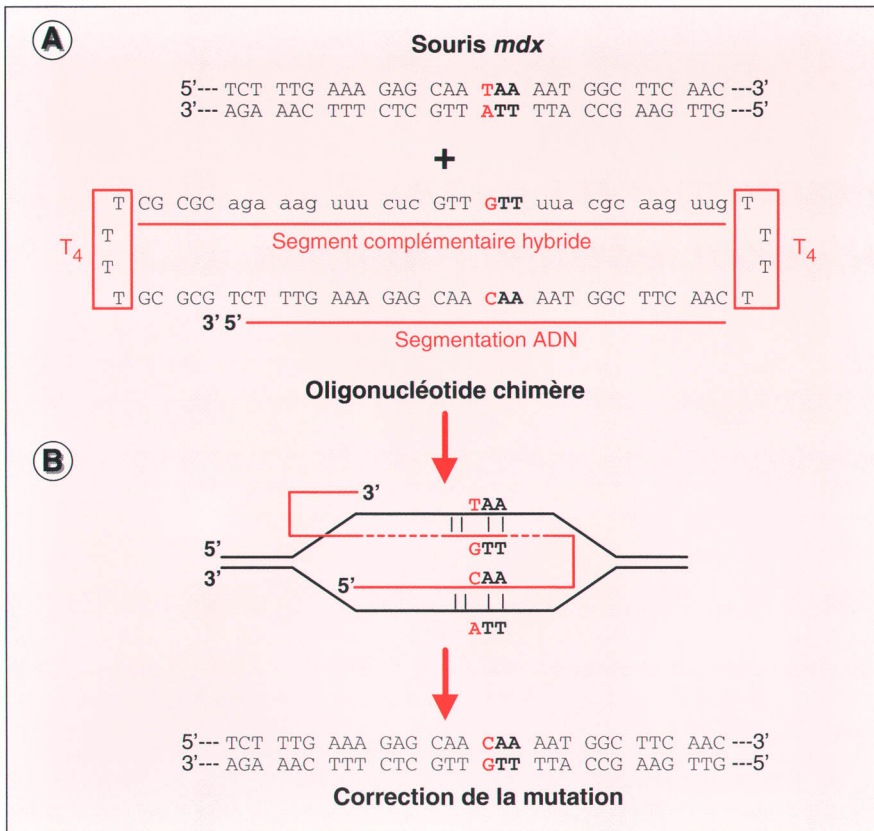


Figure 1. **Correction d'une mutation ponctuelle par des oligonucléotides chimères.** A. L'exemple représenté ici est le gène de la dystrophine chez la souris mdx qui présente une mutation (C → T en position 3184, en rouge) entraînant la formation d'un codon stop TAA. L'oligonucléotide chimère ARN/ADN comprend de 5' en 3': (1) un segment ADN de 30 bases de séquence homologue à la cible sauf au niveau de la base à corriger; (2) un segment (T)₄ favorable au repliement de l'oligonucléotide; (3) un segment complémentaire au premier segment ADN mais de chimie hybride ARN/ADN où l'ARN (bases en lettres minuscules) est interrompu par un court segment d'ADN centré sur la base à corriger (4) une séquence non homologue à la cible et riche en GC pour favoriser le repliement de l'oligonucléotide en « haltère ». B. Les données actuelles suggèrent que la première étape de correction implique l'hybridation de chaque « brin » de l'oligonucléotide chimère avec le brin complémentaire de la séquence cible d'ADN. L'oligonucléotide est en rouge et les pointillés correspondent à l'ARN. Dans l'oligonucléotide chimère, les nucléotides de chimie ARN modifié en 2' du sucre par un groupement 2'Ométhyl sont indiqués en minuscules.

Enfin, les deux articles les plus récents décrivent l'utilisation d'oligonucléotides chimères dans deux modèles de dystrophie de Duchenne, dus à des mutations ponctuelles du gène codant la dystrophine. Il s'agit des souris mdx porteuses d'une mutation introduisant un codon stop dans l'exon 23 [1], et des chiens GRMD dont la mutation d'un site d'épissage dans l'intron 6 conduit à la délétion de l'exon 7 [2]. Les résultats sont dans ces deux cas bien moins spectaculaires, puisque la

correction du gène n'est observée que pour très peu de cellules et exclusivement au niveau des points d'injection intramusculaire et du trajet de l'aiguille. On peut cependant noter que 10 à 20% des fibres musculaires dans lesquelles les oligonucléotides ont pénétré présentent une correction de la mutation, et que, comme dans les études précédentes, cette conversion semble stable à long terme. Les oligonucléotides chimères sont donc capables de modifier la

séquence de l'ADN *in situ*, aussi bien dans des cellules en culture qu'*in vivo*. De plus, la mutagenèse ciblée de plantes a également été réalisée, avec une efficacité de un à trois ordres de grandeurs supérieure aux procédés de mutagenèse aléatoire, ouvrant ainsi des possibilités d'applications agro-industrielles considérables [10-12].

Quels seraient les avantages potentiels et les difficultés de cette « chirurgie » de l'ADN par des oligonucléotides chimères? Tout d'abord, cette approche ne se heurte pas, en théorie, aux difficultés rencontrées pour exprimer des gènes à partir de vecteurs viraux (persistance et fidélité de l'expression, risque de mutagenèse insertionnelle) et permet d'envisager une thérapie génique dans les cas de mutations à effet dominant. En revanche, elle est pour l'instant restreinte aux situations dans lesquelles la mutation est précisément connue, et uniquement ponctuelle. Enfin, l'efficacité de transfert de l'oligonucléotide et son ciblage vers un organe précis, restent encore des obstacles pratiques majeurs, même si des méthodes commencent à émerger pour délivrer des quantités importantes d'oligonucléotides, dans le foie par exemple (polyéthylèneimine lactosylé ou liposomes anioniques [13]). Les résultats obtenus dans le muscle pourraient sans doute être améliorés en utilisant une technique plus efficace de transfection de l'oligonucléotide, telle que l'électro-transfert [14, 15]. Enfin, les développements de la thérapie cellulaire pourraient permettre d'envisager, dans certains cas, la correction de mutations *ex vivo* suivie d'une greffe de ces cellules autologues. De nombreuses questions fondamentales restent toutefois en suspens. Tout d'abord, la spécificité de cette méthode, c'est-à-dire la modification du seul gène ciblé, est cruciale et reste à définir. De plus, l'utilisation des oligonucléotides chimères est encore mal maîtrisée [16]. En particulier, des efficacités de mutations très variables peuvent être obtenues entre deux séries d'expériences *a priori* identiques [17]. La capacité effective des oligonucléotides chimères à former une structure en double brin ainsi que leur qualité pourraient être des paramètres parti-

Tableau I. Utilisation *in vivo* des oligonucléotides chimères.

Gène	Oligonucléotide	Efficacité de l'ADN et conséquences protéiques	Réf
Facteur IX Rat normal 5'---ATAGT	5'---ATCGT---3' ODN/PEI (25 kDa) lactosylé Injections intraveineuses	Foie: 40% Diminution de moitié de l'activité du facteur IX	[7]
UDP-glucuronosyl transférase (UGT1A1) Rat Gunn 5'---TGAAA---3'	5'---TGGAAA---3' ODN/PEI (25 kDa) lactosylé ou liposomes anioniques Injections intraveineuses	Hépatocytes: 20% Production de protéine UGT1A1 normale Diminution de la bilirubine	[8]
Tyrosinase Souris albinos 5'---CTCTA---3'	5'---CTGTA---3' Application locale: topique ou intradermique	Mélanocytes: 40 % Apparition locale de pigmentation Détection de mélanine	[9]
Dystrophine Souris mdx: exon 23 5'---AATAA---3'	5'---AACAA---3' Injection intramusculaire	Muscle Production de dystrophine normale	[1]
Chien GRMD: intron 6 5'---TCGGG---3'r	5'---TCAGG---3' Injection intramusculaire	Muscle : < 5% dans région injectée Production de dystrophine normale	[2]

La base du gène cible à modifier est représentée en rouge, ainsi que le nucléotide correspondant de l'oligonucléotide chimère. Dans le cas du gène UGT1A1 (rat Gunn), l'oligonucléotide permet la correction d'une délétion d'une paire de base. ODN: oligonucléotide. PEI: polyéthylénimine.

culièrement critiques. Il apparaît évident que l'essor de cette technique dépendra en grande partie d'une meilleure connaissance des paramètres à optimiser ainsi que d'une compréhension précise des mécanismes moléculaires en jeu. Ceux-ci sont en effet encore largement inconnus, et il n'est donc pas actuellement possible de prédire quels gènes ni quels types de mutations sont susceptibles d'être corrigés par cette approche, ni si le processus sera actif dans les tissus d'intérêt clinique. *A priori*, le mécanisme de réparation impliquerait une première étape d'association de l'oligonucléotide avec la séquence cible, suivie d'une prise en charge par la machinerie de réparation des mésappariements. *In vitro*, l'association d'un oligonucléotide chimère avec une séquence d'ADN simple brin cible peut-être catalysée par la recombinaison bactérienne recA. Dans les cellules eucaryotes, il est proposé que les deux

brins de l'oligonucléotide s'hybrident chacun avec un des deux brins d'ADN, et qu'une recombinaison pourrait aussi jouer un rôle dans cette étape d'appariement. Quant à la deuxième étape, la réparation elle-même, son étude a bénéficié du développement d'un système *in vitro* reposant sur la correction d'un gène de résistance à la kanamycine par des extraits de cellules HuH7 d'origine hépatique [18]. Il a été en particulier montré que la protéine MSH2 (*mismatch repair*) – essentielle à la réparation de mésappariements – est absolument nécessaire à l'activité de correction du gène par les oligonucléotides chimères. Pour la première étape, c'est la portion totalement ADN de l'oligonucléotide chimère qui sert de matrice à la correction [19], et cette région d'ADN doit être suffisamment longue (13 à 25 nucléotides) pour que la conversion de paires de bases puisse avoir lieu. Si seule la partie ADN possède la modi-

fication et que l'autre brin, la portion chimère ARN/ADN, est de séquence identique à la cible, la correction a tout de même lieu. Les auteurs n'observent aucune diminution de l'efficacité si ce deuxième brin est totalement ARN, mais, en revanche, un oligonucléotide entièrement ADN est, lui, beaucoup moins efficace. De façon tout à fait spectaculaire, il a été montré qu'un oligonucléotide simple brin constitué uniquement d'ADN, pourvu qu'il possède trois liaisons phosphorothioate à ses extrémités, est tout aussi performant que l'oligonucléotide chimérique dans ce test *in vitro* [20]. Des travaux tout récents démontrent d'ores et déjà l'efficacité des oligonucléotides simple brin modifiés dans les systèmes cellulaires [21, 22]. Il restera bien sûr à confirmer ces résultats très prometteurs sur les modèles *in vivo* dans lesquels les oligonucléotides chimères de première génération ont déjà fait leurs preuves.

Si la capacité de réaliser des corrections de mutations ponctuelles par transfert d'ADN simple brin (~ 50 nucléotides) dans des cellules humaines en culture ou chez la levure est connue de longue date, les efficacités rapportées jusqu'à présent demeureraient très faibles (de ~ 10⁻³ à ~ 10⁻⁴ chez la levure). Le chemin parcouru peut sembler tortueux, avec le passage par les chimères ARN/AFD, pour peut-être redécouvrir finalement le potentiel des oligonucléotides simple brin... Mais, s'il s'avère effectivement possible de gagner plusieurs ordres de grandeur d'efficacité de recombinaison en utilisant des oligonucléotides stabilisés par des liaisons phosphorothioates – ou d'autres chimies utilisées avec succès pour les oligonucléotides antisens –, les applications de cette approche, tant pour la thérapie génique que pour la génomique fonctionnelle, seront gigantesques ■

RÉFÉRENCES

- Rando TA, Disatnik MH, Zhou LZ. Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5363-8.
- Bartlett RJ, Stockinger S, Denis MM, et al. *In vivo* targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 615-22.
- Kotani H, Germann MW, Andrus A, Vinayak R, Mullah B, Kmiec EB. RNA facilitates RecA-mediated DNA pairing and strand transfer between molecules bearing limited regions of homology. *Mol Gen Genet* 1996; 250: 626-34.
- Yoon K, Cole-Strauss A, Kmiec EB. Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2071-6.
- Cole-Strauss A, Yoon K, Xiang Y, et al. Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science* 1996; 273: 1386-9.
- van Der Steege G, Schuilenga-Hut PH, Buys CH, Scheffer H, Pas HH, Jonkman MF. Persistent failure in gene repair. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 305-6.
- Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CJ. *In vivo* site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Med* 1998; 4: 285-90.
- Kren BT, Parashar B, Bandyopadhyay P, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Steer CJ. Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10349-54.
- Alexeev V, Igoucheva O, Domashenko A, Cotsarelis G, Yoon K. Localized *in vivo* genotypic and phenotypic correction of the albino mutation in skin by RNA-DNA oligonucleotide. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 43-7.
- Beetham PR, Kipp PB, Sawycky XL, Arntzen CJ, May GD. A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8774-8.
- Zhu T, Peterson DJ, Tagliani L, St Clair G, Baszczynski CL, Bowen B. Targeted manipulation of maize genes *in vivo* using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8768-73.
- Zhu T, Mettenberg K, Peterson DJ, Tagliani L, Baszczynski CL. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 555-8.
- Bandyopadhyay P, Ma X, Linehan-Stieers C, Kren BT, Steer CJ. Nucleotide exchange in genomic DNA of rat hepatocytes using RNA/DNA oligonucleotides. Targeted delivery of liposomes and polyethyleneimine to the asialoglycoprotein receptor. *J Biol Chem* 1999; 274: 10163-72.
- Mir LM, Bureau MF, Rangara R, Schwartz B, Scherman D. Long-term, high level *in vivo* gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *CR Acad Sci Paris* 1998; 321: 893-9.
- Mir L, Bureau M, Gehl J, et al. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4262-7.
- Zhang Z, Eriksson M, Falk G, et al. Failure to achieve gene conversion with chimeric circular oligonucleotides: potentially misleading PCR artifacts observed. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1998; 8: 531-6.
- Gura T. Repairing the genome's spelling mistakes. *Science* 1999; 285: 316-8.
- Cole-Strauss A, Gamper H, Holloman WK, Munoz M, Cheng N, Kmiec EB. Targeted gene repair directed by the chimeric RNA/DNA oligonucleotide in a mammalian cell-free extract. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 1323-30.
- Gamper HB, Jr., Cole-Strauss A, Metz R, Parekh H, Kumar R, Kmiec EB. A plausible mechanism for gene correction by chimeric oligonucleotides. *Biochemistry* 2000; 39: 5808-16.
- Gamper HB, Parekh H, Rice MC, Bruner M, Youkey H, Kmiec EB. The DNA strand of chimeric RNA/DNA oligonucleotides can direct gene repair/conversion activity in mammalian and plant cell-free extracts. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 4332-9.
- Igoucheva O, Alexeev V, Yoon K. Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells. *Gene therapy* 2001; 8: 391-9.
- Parekh-Olmedo, Czymmek K, Kmiec EB. Targeted gene repair in mammalian cells using chimeric RNA/DNA oligonucleotides and modified single stranded vectors. 2001 *Science online*. www.stke.org

Jean-Paul Concordet

Département Génétique, Développement et Pathologies Moléculaires, ICGM, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.
e.mail : concordet@cochin.inserm.fr

Carine Giovannangeli

Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Inserm U.201 - CNRS UMR 8646, 43, rue Cuvier, 75005 Paris, France.
e.mail : giovanna@mnhn.fr

TIRÉS À PART

J.-P. Concordet.