

La stratégie antisens : nouvelles approches thérapeutiques

De nouvelles approches thérapeutiques visent à moduler sélectivement l'expression des gènes. Dans la stratégie antisens, les oligonucléotides, synthétiques ou produits *in situ* par des constructions d'ADN, sont utilisés pour reconnaître spécifiquement un ARN messager. Le but est d'inhiber la synthèse de la protéine correspondante, soit en induisant le clivage de l'ARNm par la RNase H, soit en bloquant physiquement l'ARNm ou en modifiant son métabolisme. Une importante recherche se développe pour la mise au point d'oligonucléotides modifiés et de transporteurs, afin d'améliorer la biodisponibilité et les propriétés pharmacocinétiques de ces nouveaux agents. L'efficacité de ces mécanismes est testée sur des cultures cellulaires, mais aussi *in vivo* sur des modèles animaux de tumeurs et d'infections virales. Les premiers essais cliniques entrepris concernent le SIDA et des cancers, mais la thérapeutique antisens pourrait être appliquée demain à d'autres maladies : des parasitoses (leishmanioses, trypanosomiasés, paludisme), des maladies inflammatoires (par exemple, en inhibant l'expression du récepteur de l'interleukine-1) ou des affections cardiovasculaires (par exemple, inhibition de la resténose après angioplastie par blocage de la prolifération des cellules musculaires lisses sub-intimales).

Claude Hélène
Ester Saison-Behmoaras

ADRESSE

C. Hélène : *professeur à l'université*. E. Saison-Behmoaras : *professeur à l'université*. Laboratoire de biophysique, Inserm U. 201 - Cnrs URA 481, Muséum national d'histoire naturelle, 43, rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France.

TIRÉS A PART

C. Hélène.

m/s n° 3 vol. 10, mars 94

La plupart des médicaments actuellement disponibles ont pour cible des protéines : des protéines de structure (par exemple, la tubuline cible de médicaments anti tumoraux), des enzymes (par exemple, les inhibiteurs des enzymes de biosynthèse du cholestérol), des récepteurs membranaires (par exemple, les anti-histaminiques ou les benzodiazépines). Dans quelques cas, le matériel génétique, l'ADN, est la cible de médicaments, comme

les agents intercalants utilisés en chimiothérapie antitumorale. Cependant, même dans ce cas, des enzymes sont impliquées dans le mécanisme d'action, comme les topoisomérases qui forment un complexe ternaire ADN-intercalant-topoisomérase et induisent des coupures de l'ADN. Quelques rares médicaments (certains stéroïdes) agissent sur l'expression des gènes en se fixant sur des protéines de contrôle comme les facteurs de transcription.

RÉFÉRENCES

1. Hélène C, Toulmé JJ. Specific-regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1049: 99-125.
2. Hélène C. Rational design of sequence-specific oncogene inhibitors based on antisense and antigene oligonucleotides. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1466.
3. Hélène C. The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming oligonucleotides. *Anti-Cancer Drug Design* 1991; 6: 569-84.
4. Thuong NT, Hélène C. Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides. *Angewandte Chemie Intern Ed English* 1993; 32: 666-90.
5. Gait MJ, Karn J. RNA recognition by the human immunodeficiency virus Tat and Rev proteins. *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 255-9.
6. Glusel C, Ugarte E, Enjolras N, Vas-seur M, Blumenfeld M. *Ex vivo* regulation of specific gene expression by nanomolar concentration of double-stranded dumbbell oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3405-11.
7. Homann M, Tzortzakaki S, Ritnner K, Szcakiel G, Tabler M. Incorporation of the catalytic domain of a hammerhead ribozyme into antisense RNA enhances its inhibitory effect on the replication of human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 2809-14.
8. Rossi JJ, Elkins D, Zaia JA, Sullivan S. Ribozymes as anti-HIV-1 therapeutic agents: principles, applications, and problems. *Aids Res Hum Retrovir* 1992; 8: 183-9.
9. Yu M, Ojwang J, Yamada O, Hempel A, Rapaport J, Looney D, Wong-Staal F. A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6340-4.
10. Cazenave C, Loreau N, Thuong NT, Toulmé JJ, Hélène C. Enzymatic amplification of translation inhibition of rabbit β -globin mRNA mediated by anti-messenger oligodeoxynucleotides covalently linked to intercalating agents. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 4717.
11. Dash PLI, Knapp M, Kandel ER, Goel P. Selective elimination of mRNAs *in vivo*: complementary oligodeoxynucleotides promote RNA degradation by an RNase H-like activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7896-900.
12. Monia BP, Lesnik EA, Gonzalez C, Lima WF, McGee D, Guinosso CJ, Kawasaki AM, Cook PD, Freier SM. Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J Biol Chem* 1993; 268: 14514-22.

Depuis quelques années, de nouvelles approches thérapeutiques se développent qui consistent à moduler sélectivement l'expression des gènes, en agissant directement sur les acides nucléiques [1, 2].

1. Dans la stratégie antisens, un enchaînement de nucléotides (oligonucléotide) est utilisé pour reconnaître spécifiquement un ARN messager et inhiber la synthèse de la protéine correspondante. Des ARN antisens peuvent être produits directement à l'intérieur d'une cellule à l'aide d'une construction génétique dans laquelle tout ou partie d'un gène (ou d'un ADNc) est placé, dans une orientation opposée à celle du gène lui-même, sous le contrôle d'un promoteur, inductible ou non, qui règle l'expression de l'ARN antisens.

2. Dans la stratégie « triple hélice » (ou « anti-gène ») l'oligonucléotide se fixe sur l'ADN et, par formation locale d'une triple hélice, empêche la transcription d'un gène. Différents sites du gène peuvent être choisis pour cible selon que l'on désire inhiber la fixation de facteurs de transcription ou empêcher l'initiation ou l'élongation de l'ARN messager transcrit [3, 4].

3. Des oligonucléotides en simple ou en double hélice peuvent également être utilisés pour piéger des protéines de régulation de l'expression génétique et les détourner de leur site normal d'action (stratégie sens). Si la protéine visée est d'origine virale, un effet spécifique peut être obtenu. Si la protéine est un facteur de transcription cellulaire, l'effet de l'oligonucléotide sens retentira sur l'expression de plusieurs gènes, les facteurs de transcription étant généralement impliqués dans la modulation du niveau de transcription de plusieurs gènes [5, 6].

4. Des oligoribonucléotides possédant des structures tridimensionnelles particulières peuvent induire des coupures dans un ARN choisi pour cible. Ces catalyseurs ou ribozymes peuvent, comme les ARN antisens, être produits *in situ* à l'aide de constructions génétiques appropriées [7-9].

Cet article portera sur la seule technologie des antisens, même si bien des aspects liés au développement

thérapeutique de ces molécules sont communs aux autres approches également. Des oligonucléotides ou des molécules voisines, conçus sur la base d'une interaction extrêmement spécifique avec un seul ARN messager ou un ARN viral constituent-ils une nouvelle classe de futurs médicaments? La production d'ARN antisens dans les cellules humaines à partir de constructions génétiques a-t-elle un avenir en thérapie génique? Au travers des exemples actuellement disponibles au niveau cellulaire et animal, nous tenterons de répondre à ces deux questions en mettant en lumière les problèmes qui restent à résoudre dans ces deux voies de développement de la stratégie antisens. Un nombre limité de références (récentes pour la plupart) est cité dans cet article. Le premier numéro de chaque année de la revue *Antisense Research and Development* donne une liste exhaustive des articles publiés au cours de l'année précédente.

Les mécanismes d'action des oligonucléotides antisens

Mécanisme impliquant la ribonucléase (figure 1)

Depuis la démonstration du rôle de la ribonucléase H (RNase H) dans le mécanisme d'action d'oligodésoxynucléotides antisens injectés dans les ovocytes de xénope [10-11], de nombreuses expériences dans des milieux acellulaires ont montré que la présence de cette enzyme est essentielle pour assurer l'efficacité d'oligonucléotides antisens dirigés contre la partie codante d'un ARN messager [12]. La RNase H reconnaît les hybrides ADN/ARN et hydrolyse seulement les liaisons phosphodiester de la partie ARN. Cette activité enzymatique est présente dans toutes les cellules puisqu'elle est nécessaire pour éliminer les amorces ARN utilisées lors de la réplication de l'ADN. Des cellules en division rapide contiennent un taux élevé de RNase H. Il existe en fait plusieurs enzymes dans les cellules eucaryotes [13]. Les transcriptases inverses possèdent également une activité RNase H associée.

L'activité enzymatique de la RNase H est très sensible à la nature chimique des modifications apportées à des oligonucléotides antisens. Seuls les désoxyribonucléotides naturels, et leurs analogues comportant des phosphorothioates ou des phosphorodithioates, sont capables d'induire une coupure de l'ARN choisi pour cible. Les oligoribonucléotides, les oligonucléotides comportant des modifications en position 2' du sucre (par exemple 2'-fluoro ou 2'-O-alkyl), les oligonucléotides synthétisés avec les anomères α des nucléotides, les oligométhylphosphonates, les analogues possédant un enchaînement polyamide (PNA)... [14] ne possèdent pas la propriété d'induire l'activité enzymatique de la RNase H sur un ARN, même si, dans certains cas, l'hybride

oligonucléotide-ARN est encore capable de fixer la protéine (voir figure 3 pour les structures chimiques de ces oligonucléotides modifiés).

Dans certains systèmes acellulaires, il est possible d'identifier les fragments de l'ARN messager résultant de la coupure par la RNase H et de démontrer que l'oligonucléotide était bien fixé sur la séquence choisie pour cible. Ce type d'expérience permet également de mettre en évidence la présence éventuelle de sites secondaires de coupure, dus à la fixation de l'oligonucléotide au niveau de séquences qui ne sont pas parfaitement complémentaires. Le site de reconnaissance des RNases H eucaryotes est de l'ordre de cinq paires de bases. Des hybrides oligonucléotides-ARN peuvent donc servir de substrats à ces enzymes,

même s'il existe des mésappariements. C'est, en particulier, ce qui est observé si l'on utilise des oligonucléotides de taille trop importante (voir ci-dessous le paragraphe sur la spécificité). Dans les cellules en culture, il est extrêmement difficile d'apporter la preuve que la RNase H est impliquée dans le mécanisme d'action d'un oligonucléotide antisens car, en général, les fragments d'ARN messager sont rapidement dégradés par des ribonucléases cellulaires. Il est donc seulement possible de démontrer la disparition de l'ARN messager, mais cette disparition peut avoir d'autres origines que l'action de la RNase H (voir ci-dessous).

Le rôle central joué par la RNase H dans le mécanisme d'action des oligonucléotides a été démontré dans plusieurs systèmes cellulaires en utilisant des oligonucléotides « chimères » dont seule la partie centrale permet l'induction de la coupure par la RNase H (phosphodiester ou phosphorothioates), les parties latérales (5' et 3') de l'oligonucléotide étant synthétisées avec des enchaînements résistants aux nucléases et n'induisant pas de coupure de l'ARN par la RNase H (par exemple, méthylphosphonates, 2'-O-alkyl ou 2'-fluoro-oligonucléotides) [12]. La « fenêtre » induisant l'activité RNase H doit avoir une longueur minimum de cinq nucléotides dans le cas de l'ARN-messager du gène Ha-ras. L'effet biologique attendu est alors observé dans des cellules en culture. Un oligonucléotide qui ne possède pas de « fenêtre » capable d'induire l'action de la RNase H n'a aucun effet. La spécificité vis-à-vis d'une mutation de l'ARN messager est conservée avec les oligonucléotides « chimères ».

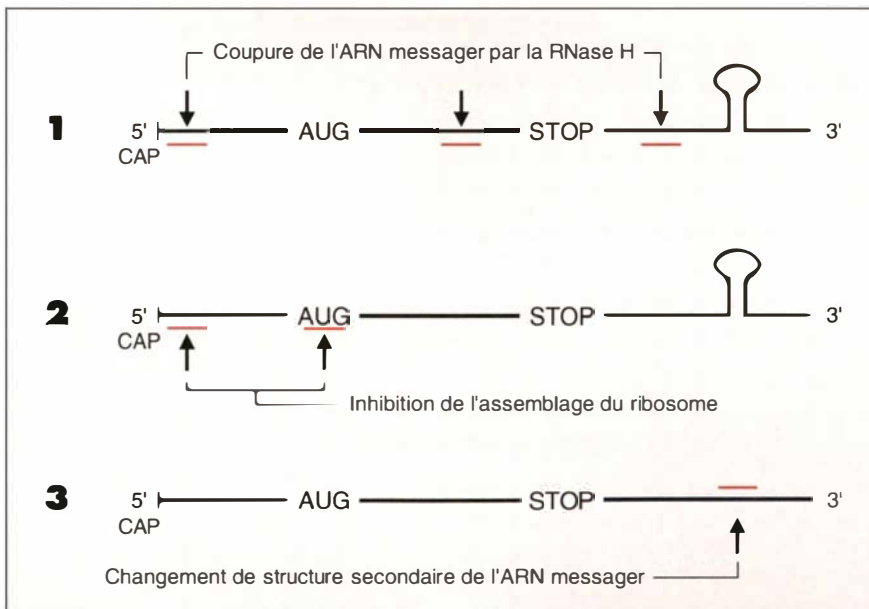


Figure 1. **Mécanismes d'action des oligonucléotides antisens.** (1) Mécanisme impliquant la RNase H: la RNase H reconnaît les hybrides ADN/ARN et hydrolyse seulement les liaisons phosphodiester de la partie ARN. Seuls les désoxyribonucléotides naturels, et leurs analogues comportant des phosphorothioates ou des phosphorodithioates, sont capables d'induire une coupure de l'ARN choisi pour cible. (2) Inhibition par blocage physique de l'ARNm: la fixation d'un oligonucléotide entre la coiffe (CAP) et le codon d'initiation AUG, ou dans une région recouvrant ce codon d'initiation, empêche l'assemblage correct de la machinerie de traduction. (3) Changement de la structure secondaire de l'ARNm: si la fixation d'un oligonucléotide modifie ces structures et rend certaines régions de l'ARN messager accessibles aux ribonucléases, le temps de vie et la concentration stationnaire du message seront diminués.

Mécanismes ne faisant pas appel à une coupure de l'ARN messager par la ribonucléase

Inhibition par blocage physique de l'ARN messager (figure 1)

Il ne faudrait pas conclure des résultats décrits ci-dessus que le mécanisme impliquant la RNase H est le seul qui permette d'expliquer les effets biologiques des oligonucléotides antisens dans des cellules ou

RÉFÉRENCES

13. Cazenave C, Frank P, Büsen W. Characterization of ribonuclease H activities present in two cell-free protein synthesizing systems, the wheat germ extract and the rabbit reticulocyte lysate. *Biochimie* 1993; 75 : 113-22.

14. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Blumhardt O. Peptide nucleic acids (PNAs) : potential anti-sense and anti-gene agents. *Anti-Cancer Drug Design* 1993; 8 : 53-63.

15. Bertrand JR, Imbach JL, Paoletti C, Malvy C. Comparative activity of α - and β -anomeric oligonucleotides on rabbit β -globin synthesis : inhibitory effect of cap targeted α -oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164 : 311-8.

16. Boiziau C, Kurfurst R, Cazenave C, Roig V, Thuong NT, Toulmé JJ. Inhibition of translation initiation by antisense oligonucleotides *via* an RNase-H independent mechanism. *Nucleic Acids Res* 1991; 19 : 1113-9.

17. Hanvey JC, Peffer NJ, Bisi JE, Thomson SA, Cadilla R, Josey JA, Ricca DJ, Hassman CF, Bonham MA, Au KG, Carter SG, Bruckenstein DA, Boyd AL, Noble SA, Babiss LE. Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science* 1992; 258 : 1481-5.

18. Giovannangeli C, Thuong NT, Hélène C. Oligonucleotide clamps arrest DNA synthesis on a single-stranded DNA target. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 : 10013-7.

19. Bordier B, Hélène C, Barr PJ, Litvak S, Sarih-Cottin L. *In vitro* effect of antisense oligonucleotides on human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res* 1992; 20 : 5999-6006.

20. Chiang MY, Chan H, Zounes MA, Freier SM, Lima WF, Bennett FC. Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1991; 266 : 18162-71.

21. Kulka M, Smith CC, Aurelian L, Fiselevich R, Meade K, Miller P, Ts'o POP. Site specificity of the inhibitory effects of oligo(nucleoside methylphosphonate)s complementary to the acceptor splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early mRNA 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86 : 6868-72.

22. Dominski Z, Kole R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 : 8673-7.

23. Jacob A, Duval-Valentin G, Ingrand D, Thuong NT, Hélène C. Inhibition of viral growth by an α -oligonucleotide directed to the splice junction of herpes simplex virus type-1 immediate-early pre-mRNA species 22 and 47. *Eur J Biochem* 1993; 216 : 19-24.

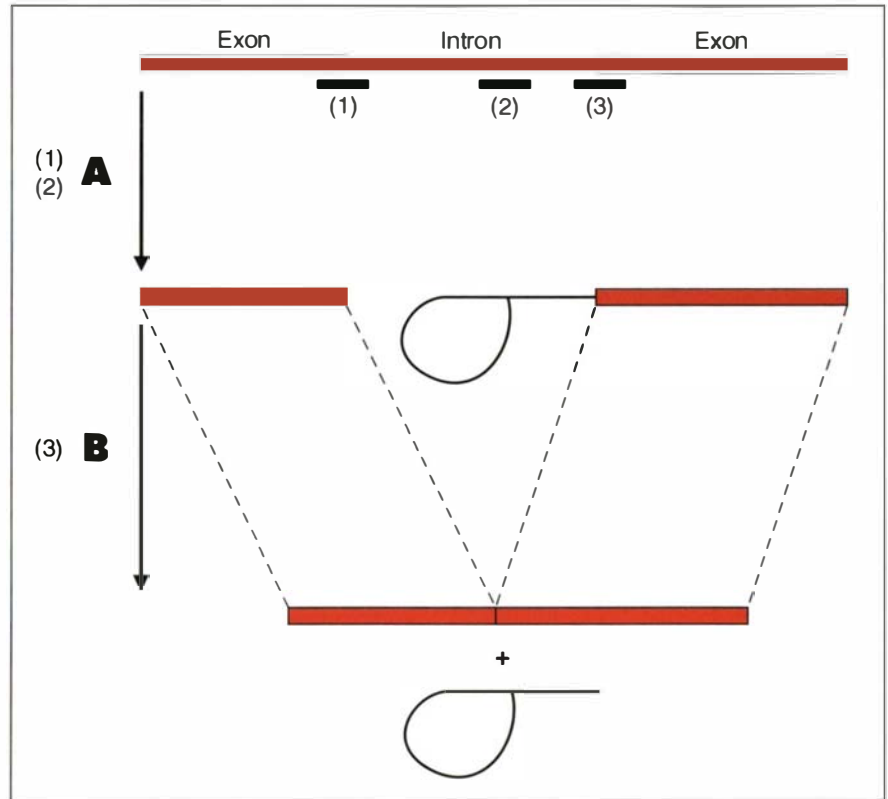


Figure 2. Inhibition de l'épissage par des oligonucléotides antisens. En se fixant au niveau des jonctions exon-intron (1, 3), un oligonucléotide peut empêcher le fonctionnement normal de la machinerie d'épissage. D'autres sites fonctionnels importants pour l'épissage, situés à l'intérieur des introns (par exemple, le site de formation de la structure en lasso (3)), peuvent également être la cible d'oligonucléotides antisens. Les premières étapes de l'épissage, clivage du site « donneur » en 5' de l'intron et formation du lasso peuvent, en théorie, être bloquées par les oligonucléotides 1 et 2, alors que la dernière étape, le clivage du site accepteur en 3' de l'intron, pourrait être bloquée par l'oligonucléotide 3.

dans des extraits acellulaires. Par exemple, en se fixant sur l'extrémité 5', non codante, de l'ARN messager de la β -globine, des oligonucléotides en série α (synthétisés avec les anomères α des nucléotides au lieu des anomères β naturels) sont capables d'inhiber la synthèse de la protéine [15, 16]. Cependant, ils n'ont aucun effet lorsqu'ils se fixent sur la région codante de l'ARN messager. Ces résultats suggèrent que la fixation d'un oligonucléotide entre la coiffe (CAP) et le codon d'initiation AUG, ou dans une région recou-

vrant ce codon d'initiation, empêche l'assemblage correct de la machinerie de traduction (protéines spécifiques de la coiffe, fixation de la sous-unité 40S du ribosome, glissement de cette sous-unité le long de la région 5' non codante, fixation de la sous-unité 60S...)

Des oligomères, synthétisés avec un enchaînement polyamide (PNA) et les bases naturelles des acides nucléiques, sont capables de bloquer la synthèse protéique, même lorsqu'ils sont fixés sur la partie codante du message [17]. Cependant, les exem-

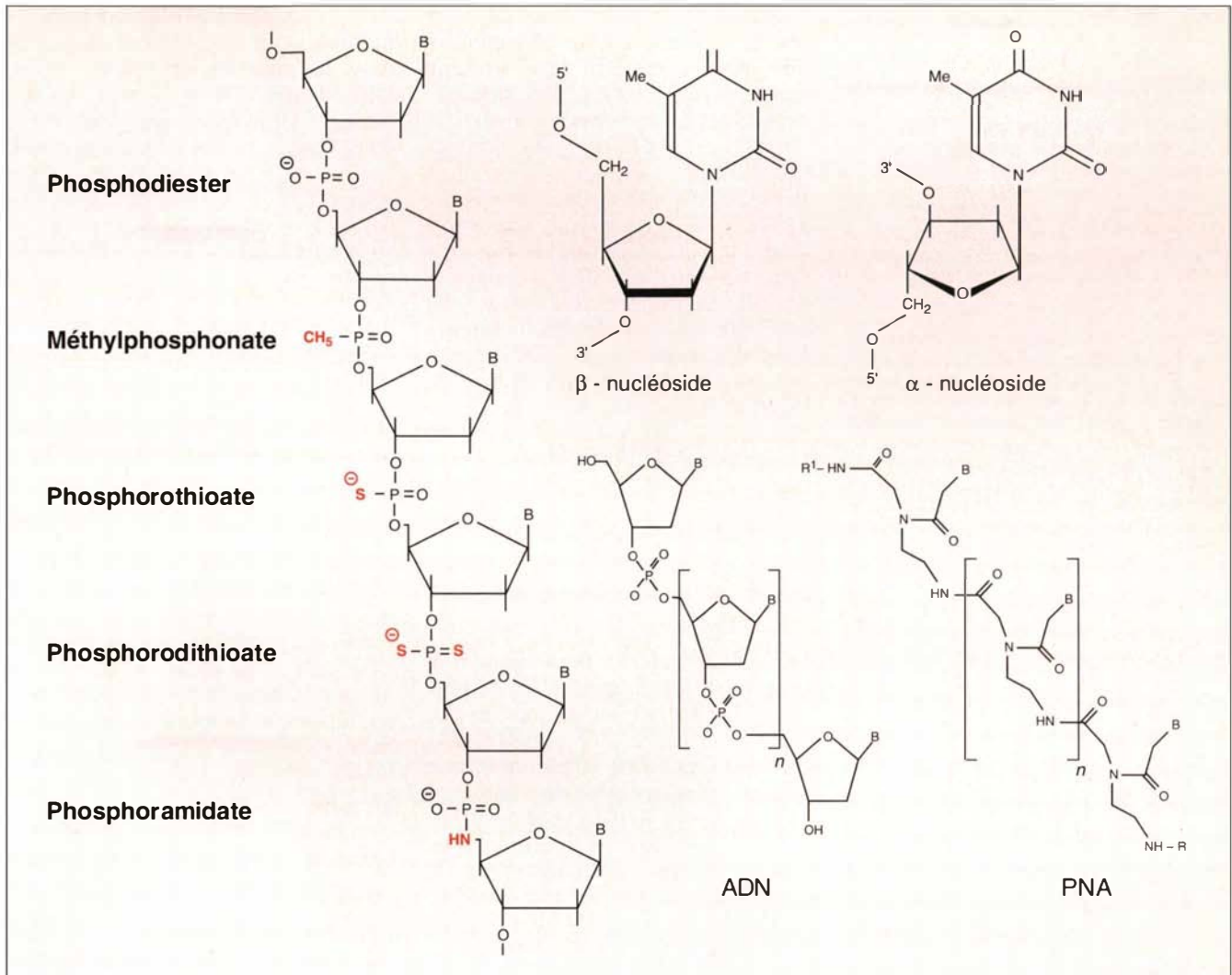


Figure 3. **Oligonucléotides utilisés dans la stratégie antisens.** Pour protéger complètement l'oligonucléotide contre les endonucléases, il est nécessaire de modifier l'enchaînement phosphodiester. Les phosphorothioates sont actuellement les plus utilisés car leur synthèse est facile. La substitution du sucre en position 2' (2'-O-alkyl, 2'-fluoro...) confère également une résistance vis-à-vis des nucléases. Il en est de même des oligométhylphosphonates qui possèdent un squelette non chargé, des oligo- α -désoxynucléotides dans lesquels l'anomère β naturel des nucléotides est remplacé par l'anomère α , des PNA dans lesquels le squelette phosphodiester est remplacé par un enchaînement polyamide.

ples décrits à ce jour font appel à des PNA qui forment localement une triple hélice (complexes impliquant deux PNA par ARN). Une telle triple hélice pourrait constituer un obstacle suffisant pour que la machinerie de traduction soit bloquée dans sa progression, comme c'est le cas avec des oligonucléotides capables de former une triple hélice sur un ADN simple brin (« pinces ») et de bloquer la réplication de cet ADN [18].

Il est important de noter que des protéines cellulaires, en se fixant sur

l'hybride oligomère-ARN, peuvent jouer un rôle important dans le mécanisme d'action d'oligonucléotides qui n'induisent pas de coupure par la RNase H. La RNase H, elle-même, pourrait jouer un tel rôle en se fixant sur l'hybride, même si elle est ensuite incapable d'exercer son activité enzymatique. Il est vraisemblable qu'un tel mécanisme est important dans l'inhibition de la transcription inverse d'un ARN viral par un oligomère antisens incapable d'induire la coupure par la RNase H, ou en présence d'une transcrip-

tase inverse dépourvue d'activité RNase H [19, 94]. La transcriptase inverse peut, en effet, se fixer sur l'hybride ARN-oligomère et le complexe ternaire, ainsi formé, arrêter l'élongation par une autre molécule de polymérase [19].

Modification du métabolisme des ARN messagers (figure 1)

Les structures secondaires (et tertiaires) des ARN messagers jouent un rôle important dans leur métabolisme, en empêchant leur dégrada-

RÉFÉRENCES

24. Lima WF, Monia BP, Ecker DJ, Freier SM. Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics. *Biochemistry* 1992; 31: 12055-61.
25. Ecker D, Vickers T, Bruice T, Freier S, Jenison R, Manoharan M, Zounes M. Pseudo-half-knot binding to RNA. *Science* 1992; 257: 958.
26. Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova DV, Ivanova EM, Ryte AS, Yurchenko DV, Vlasov VV. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6454-8.
27. Loke SL, Stein CA, Zhang XH, Mori K, Nakanishi M, Subasinghe C, Cohen JS, Neckers LM. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3474-8.
28. Stein CA, Cheng YC. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents - is the bullet really magical? *Science* 1993; 261: 1004-12.
29. Leonetti JP, Mechtü N, Degols G, Gagnor C, Lebleu B. Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2702-6.
30. Lemaître M, Bayard B, Lebleu B. Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 648-52.
31. Becker D, Meier CB, Herlyn M. Proliferation of human malignant melanomas is inhibited by antisense oligodeoxynucleotides targeted against basic fibroblast growth factor. *EMBO J* 1989; 8: 3685-91.
32. Zerial A, Thuong NT, Hélène C. Selective inhibition of the cytopathic effect of type A influenza viruses by oligodeoxynucleotides covalently linked to an intercalating agent. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 9909-19.
33. Degols G, Leonetti JP, Benkirane M, Devaux C, Lebleu B. Poly(L-lysine)-conjugated oligonucleotides promote sequence-specific inhibition of acute HIV-1 infection. *Antisense Res Dev* 1992; 2: 293-302.
34. Grigoriev M, Praseuth D, Robin P, Hemar A, Saison-Behmoaras T, Dautry-Varsat A, Thuong NT, Hélène C, Harel-Bellan A. A triple helix-forming oligonucleotide-intercalator conjugate acts as a transcriptional repressor via inhibition of NFκB binding to interleukin-2 receptor α regulatory sequence. *J Biol Chem* 1992; 267: 3389-95.
- tion par des ribonucléases cellulaires. Si la fixation d'un oligonucléotide modifie ces structures et rend certaines régions de l'ARN messager accessibles aux ribonucléases, le temps de vie et la concentration stationnaire du message seront diminués [20]. Ce mécanisme est difficile à distinguer d'un mécanisme impliquant la RNase H puisqu'une coupure au sein d'un ARN messager se traduit, la plupart du temps, par une hydrolyse rapide des fragments. La déstructuration de l'ARN messager pourrait représenter une étape importante dans le mécanisme d'action des ARN antisens produits *in situ* par des constructions génétiques, en plus de l'effet éventuel des ribonucléases spécifiques de structures d'ARN en double hélice.

Inhibition de l'épissage des ARN pré-messagers (figure 2)

En se fixant au niveau des jonctions exon-intron, un oligonucléotide peut empêcher le fonctionnement normal de la machinerie d'épissage [21-23]. D'autres sites fonctionnels importants pour l'épissage, qui sont situés à l'intérieur des introns (par exemple, le site de formation de la structure en lasso), peuvent également être la cible d'oligonucléotides antisens [22]. La fixation sur l'un des ARN nucléaires qui participe à la constitution du complexe nucléo-protéique assurant l'épissage peut entraîner une inhibition non spécifique de l'épissage.

Dans tous les cas évoqués aux paragraphes précédents, si l'oligonucléotide peut induire la coupure de l'ARN par la RNase H, ce mécanisme se superpose au mécanisme de blocage physique du processus de traduction ou d'épissage.

Les paramètres contrôlant l'efficacité des oligonucléotides antisens

De nombreux paramètres ont une influence sur l'activité antisens des oligonucléotides. Les principaux sont brièvement mentionnés ci-dessous.

La stabilité de l'oligonucléotide antisens vis-à-vis des nucléases

Il s'agit évidemment d'un paramètre

très important. Les oligonucléotides naturels sont rapidement dégradés dans les milieux de culture cellulaire, dans le plasma et dans les cellules. Les nucléases les plus actives étant des 3'-exonucléases, une modification de l'extrémité 3' des oligonucléotides est suffisante pour allonger considérablement leur temps de vie. Dans la plupart des expériences mettant en jeu des cultures cellulaires, aucun effet d'un oligonucléotide naturel n'est observé si le sérum utilisé pour assurer la croissance des cellules n'a pas été inactivé par la chaleur pour éliminer, ou au moins réduire, les activités nucléasiques. Pour protéger complètement l'oligonucléotide contre les endonucléases, il est nécessaire de modifier l'enchaînement phosphodiester. Les phosphorothioates sont actuellement les plus utilisés car leur synthèse est facile. Ils sont stables vis-à-vis des nucléases et ils induisent la coupure de l'ARN cible par la RNase H. Ils ne sont cependant pas dépourvus d'effets secondaires en raison de leur fixation sur d'autres constituants cellulaires que les ARN messagers.

La substitution du sucre en position 2' (2'-O-alkyl, 2'-fluoro...) confère également une résistance vis-à-vis des nucléases. Il en est de même des oligométhylphosphonates qui possèdent un squelette non chargé, des oligo-α-désoxynucléotides dans lesquels l'anomère β naturel des nucléotides est remplacé par l'anomère α, des PNA dans lesquels le squelette phosphodiester est remplacé par un enchaînement polyamide (figure 3). Toutes ces modifications chimiques conduisent à des oligomères dont le mécanisme d'action est indépendant de l'existence d'une activité RNase H. Il n'existe pas actuellement de démonstration réellement convaincante de leur activité antisens dans des cellules en culture, sauf dans l'inhibition de l'épissage d'ARN pré-messagers où l'activité RNase H n'est probablement pas requise [21-23]. Ils pourraient cependant exercer leur activité sur un ARN messager après épissage selon l'un des mécanismes évoqués plus haut. En particulier, les PNA qui peuvent former des triples hélices sur un ARN simple brin pourraient agir par blocage des ribosomes lors

de la phase d'élongation des chaînes polypeptidiques [14, 17].

La stabilité de l'hybride formé avec l'ARN messager

L'hybride doit être suffisamment stable pour inhiber la traduction, même lorsque la RNase H intervient dans le mécanisme d'action. Mais il ne doit pas être trop stable, sinon la sélectivité d'action sur un seul ARN messager peut être perdue car l'oligonucléotide peut alors se fixer sur des séquences présentant des mésappariements, avec une stabilité

suffisante pour inhiber la traduction (voir p. 261, le paragraphe *Spécificité*).

La structure secondaire (et tertiaire) de la région de l'ARN messager choisie pour cible [24, 25]

L'oligonucléotide peut ne pas se fixer si la déstructuration de l'ARN requiert une énergie trop importante pour exposer la séquence complémentaire. Même si l'hybride possède une énergie suffisante pour déplacer l'équilibre, le système peut être cinétiquement figé. Plusieurs

expériences ont montré que la région de l'ARN messager située au voisinage du codon d'initiation AUG était accessible à des oligonucléotides antisens ; mais ce n'est pas une règle générale (figure 4).

La structure secondaire (par exemple, épingle à cheveu) et l'auto-association de l'oligonucléotide

L'association de l'oligonucléotide avec sa cible ne pourra se dérouler favorablement que si l'hybride possède une énergie supérieure à celle de la structure propre de l'oligonucléotide. A nouveau des problèmes cinétiques peuvent empêcher la formation de l'hybride, même si l'équilibre thermodynamique lui est favorable.

Le nombre de copies de l'ARN messager

Si l'oligonucléotide n'exerce pas son action de façon catalytique, la concentration requise pour inhiber la traduction sera d'autant plus élevée que le nombre de copies de l'ARN messager sera plus élevé. Les problèmes de spécificité peuvent devenir importants si un autre ARN messager possède une séquence voisine de celle choisie pour cible et se trouve présent à une concentration élevée.

Le temps de vie de l'ARN messager et de la protéine correspondante

Si la protéine dont on veut inhiber la biosynthèse possède un long temps de vie, l'effet biologique attendu peut être fortement retardé par rapport à l'inhibition de la traduction de l'ARN messager ou à sa coupure par la RNase H. Si l'ARN messager est transcrit de façon très efficace, l'effet de l'oligonucléotide peut ne se manifester que de façon transitoire, en particulier si l'oligonucléotide est dégradé rapidement.

La fixation de protéines, *in situ*, sur l'hybride formé par l'oligonucléotide avec sa cible ARN

Ce problème a été peu ou pas abordé dans les expériences décrites à ce jour, à l'exception de la fixation de la RNase H. Cette protéine stabilise les complexes formés. Elle est susceptible de se fixer sur certains hybrides oligonucléotides-ARN

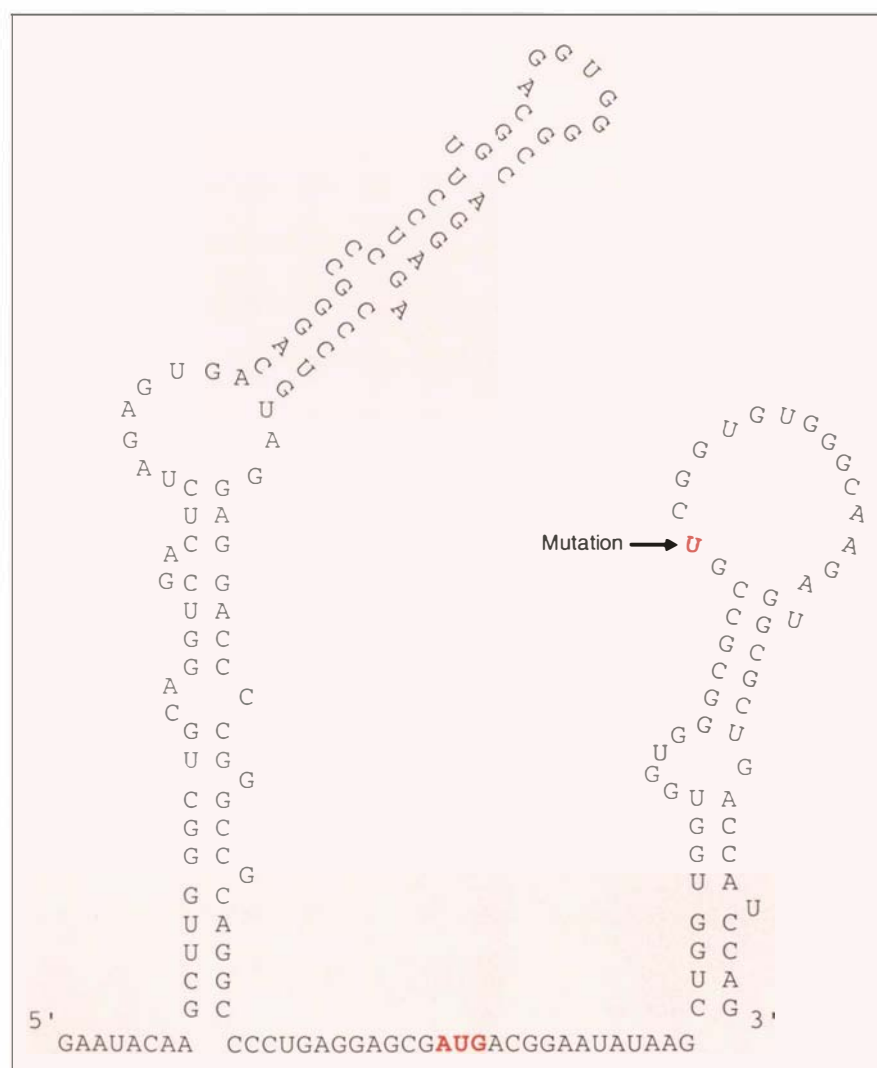


Figure 4. **Structure secondaire calculée du transcrite Ha-Ras (120 bases).** La région de l'ARNm située au voisinage du codon d'initiation AUG (en rouge sur la partie simple brin horizontale), de même que celle entourant la mutation G-U dans la boucle supérieure à droite du schéma, sont accessibles à des oligonucléotides antisens puisqu'elles ne sont pas déjà engagées dans une hybridation avec une séquence complémentaire. A l'inverse, des antisens seraient inefficaces sur des séquences des tiges double-brin.

RÉFÉRENCES

35. Grigoriev M, Praseuth D, Guieysse AL, Robin P, Thuong NT, Hélène C, Harel-Bellan A. Inhibition of interleukin-2-receptor α -subunit gene expression by oligonucleotide-directed triple helix formation. *C R Acad Sci Paris, Ser III* 1993 ; 316 : 492-5.
36. Cazenave C, Stein CA, Loreau N, Thuong NT, Neckers LM, Subasinghe C, Hélène C, Cohen JS, Toulmé JJ. Comparative inhibition of rabbit globin mRNA translation by modified antisense oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res* 1989 ; 17 : 4255-73.
37. Herschlag D. Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules *in vivo*: more isn't always better. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 6921-5.
38. Hélène C, Montenay-Garestier T, Saison T, Takasugi M, Toulmé JJ, Asseline U, Lancelot G, Maurizot JC, Toulmé F, Thuong NT. Oligodeoxynucleotides covalently linked to intercalating agents: a new class of gene regulatory substances. *Biochimie* 1985 ; 67 : 777-83.
39. Clarenc JP, Lebleu B, Léonetti JP. Characterization of the nuclear binding sites of oligodeoxyribonucleotides and their analogs. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 5600-4.
40. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 1992 ; 355 : 564-6.
41. Wang KY, McCurdy S, Shea RG, Swaminathan S, Bolton PH. A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA. *Biochemistry* 1993 ; 32 : 1899-904.
42. Crooke ST, Lebleu B. *Antisense Research and Applications*. New York : CRC Press Inc, 1993.
43. Erickson RP, Izant JG. *Gene regulation : Biology of antisense RNA and DNA*. New York : Raven Press, Ltd, 1992.
44. Whitesell I, Rosolen A, Neckers LM. *In vivo* modulation of *N-myc* expression by continuous perfusion with an antisense oligonucleotide. *Antisense Res Dev* 1991 ; 1 : 343-50.
45. Thomas BA, Wickstrom E. Daily addition of an anti-*c-myc* DNA oligomer induces granulocytic differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells in both serum-containing and serum-free media. *Oncogene Res* 1991 ; 6 : 21-32.
- même si l'activité enzymatique n'est pas induite par la fixation. Elle pourrait alors jouer un rôle important dans le mécanisme d'inhibition « physique » décrit ci-dessus. D'autres protéines cellulaires pourraient jouer un rôle similaire.
- La fixation de la ribonucléase H et la cinétique de coupure de l'ARN**
- Quand l'hybride est un substrat pour cette enzyme (oligodésoxynucleotides avec un enchaînement phosphodiester, ou phosphorothioates, ou phosphorodithioates), la RNase H (les RNases H, puisqu'il en existe plusieurs dans les cellules eucaryotes) possède une certaine spécificité vis-à-vis de la séquence de l'hybride. Pour deux hybrides de stabilité comparable, les cinétiques de coupure peuvent être très différentes.
- Le changement de structure secondaire et tertiaire de l'ARN messenger dû à la fixation de l'oligonucléotide**
- Ce changement peut entraîner une dégradation accélérée par les ribonucléases cellulaires et, donc, une réduction du temps de vie de l'ARN messenger *in situ* [20].
- La cinétique et l'efficacité de pénétration de l'oligonucléotide dans les cellules**
- Ces paramètres dépendent du type cellulaire et de la nature chimique de l'oligonucléotide. Certaines protéines membranaires fixent les oligonucléotides [25-28] mais il n'a pas été démontré qu'elles étaient impliquées dans la pénétration cellulaire. La majorité - sinon la totalité - des oligonucléotides pénètre par endocytose dans les cellules humaines en culture. Les protéines membranaires mentionnées ci-dessus pourraient être impliquées dans l'un des mécanismes d'entrée.
- La distribution intracellulaire**
- La pénétration par endocytose conduit à une localisation des oligonucléotides dans les endosomes. Il est vraisemblable qu'une faible fraction de ces oligonucléotides « fuit » les endosomes avant leur fusion avec les lysosomes et atteint la cible (ARN messenger ou pré-messenger, ADN
- sans être dégradée. On ne peut cependant pas exclure que la faible fraction active des oligonucléotides ait pénétré par une autre voie que l'endocytose. Quand des oligonucléotides sont microinjectés dans des cellules en culture, ils migrent très rapidement du cytosol vers le noyau [29]. Il en est de même après électroporation. Il est donc possible que les oligonucléotides antisens agissent en majorité dans le noyau, soit sur l'ARN pré-messenger, soit sur l'ARN messenger après épissage, mais avant la sortie du noyau. Une seule expérience, à notre connaissance, démontre qu'un oligonucléotide peut exercer son activité dans le cytosol. Il s'agit d'un oligonucléotide dirigé contre l'ARN du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) dont le cycle de reproduction est entièrement cytoplasmique [30]. Une autre expérience démontre qu'un oligonucléotide peut agir après l'étape d'épissage de l'ARN pré-messenger : un oligonucléotide dirigé contre une séquence de l'ARN messenger du b-FGF (*basic fibroblast growth factor*) située à la jonction de deux exons ne peut agir qu'après épissage puisque les deux moitiés de la cible sont séparées par la séquence d'un intron dans l'ARN pré-messenger [31].

La sélectivité de l'effet antisens

Les expériences de contrôle

Un certain nombre d'expériences sur des cultures cellulaires démontrent que l'effet des oligonucléotides antisens est spécifique de la cible choisie. La plupart de ces expériences comparent l'effet de deux oligonucléotides différents. Les contrôles les plus fréquemment utilisés sont, soit un oligonucléotide de séquence inversée par rapport à celle de l'oligonucléotide antisens, soit un oligonucléotide dans lequel deux nucléotides ont été échangés de façon à créer deux mésappariements lorsque l'oligonucléotide de « contrôle » se fixe sur la cible complémentaire de l'oligonucléotide antisens. Des séquences « brouillées » (même composition en bases mais avec une distribution « au hasard ») peuvent également être utilisées. Il est dangereux d'utiliser des oligonucléotides

de contrôle ayant une composition en bases différente de celle de l'oligonucléotide antisens, notamment avec les oligonucléotides naturels, car leur hydrolyse par les nucléases cellulaires peut changer de façon différente les concentrations respectives des nucléotides dans la cellule. Dans tous les cas, il est indispensable de vérifier, dans la banque de séquences actuellement disponible : (1) que l'oligonucléotide antisens ne possède pas d'autre(s) cible(s) complémentaire(s) que l'ARN messager dont on veut inhiber la traduction ; (2) que les oligonucléotides de contrôle n'ont pas de cibles complémentaires dans les ARN messagers cellulaires. L'utilisation de deux oligonucléotides de séquences différentes pour démontrer la sélectivité de l'effet biologique n'est pas dépourvue d'ambiguïté. Si l'effet est dû à la fixation sur une autre cible que l'ARN messager visé, le changement de séquence introduit dans l'oligonucléotide de contrôle peut également changer l'interaction avec cette cible inattendue. L'expérience la plus concluante est certainement de n'utiliser qu'un oligonucléotide, l'antisens, et de comparer son effet sur deux cibles qui ne diffèrent que par une ou plusieurs bases. Ce type d'expérience n'est malheureusement possible que dans un nombre limité de cas. Par exemple, un oligonucléotide dirigé contre l'extrémité 5' des ARN du virus de la grippe de type A inhibe l'effet cytopathogène de ce virus, alors qu'il n'a aucun effet sur un virus de type B dont la séquence 5' comporte deux nucléotides différents sur douze [32]. De même, un oligonucléotide antisens dirigé contre une séquence de l'ARN messager du gène *tal* de VIH-1-BRU a un effet antiviral beaucoup plus faible sur la souche VIH-1-ELI dont deux nucléotides sont différents dans la région cible [33]. L'effet inverse est observé quand l'oligonucléotide est complémentaire de la séquence présente dans VIH-1-ELI.

Un oligonucléotide, formant une triple hélice avec une séquence du promoteur du gène codant pour la sous-unité α du récepteur de l'interleukine 2 (IL2R α), inhibe la transcription de ce gène car il empêche la fixation d'un facteur de transcrip-

tion essentiel, le facteur NF κ B [34]. Un promoteur présentant une mutation dans le site de fixation de l'oligonucléotide, mais répondant de la même façon que le promoteur naturel à la fixation du facteur NF κ B, n'est pas affecté par le même oligonucléotide [35]. Cette expérience démontre que l'effet de l'oligonucléotide est bien dû à la fixation en triple hélice sur la cible visée dans le promoteur.

Contrôler la spécificité en contrôlant l'affinité de l'oligonucléotide pour sa cible

L'un des problèmes rencontrés dans l'analyse de la spécificité de l'effet cellulaire d'un oligonucléotide réside dans l'impossibilité de démontrer que l'expression d'un seul gène est affectée. L'utilisation de l'électrophorèse bi-dimensionnelle devrait permettre d'analyser combien de protéines voient leur expression altérée par un oligonucléotide donné. Cependant, lorsque l'ARN messager visé code pour une protéine de contrôle, impliquée dans une cascade d'événements cellulaires (c'est le cas pour la plupart des oncogènes, par exemple), plusieurs protéines verront leur expression affectée, même si l'effet de l'oligonucléotide antisens ne s'exerce que sur un seul ARN messager.

Comment « minimiser » les effets d'un oligonucléotide antisens sur des ARN messagers présentant une séquence voisine mais non identique ? Nous ne connaissons actuellement qu'une petite fraction de la séquence du génome humain ; il est donc impossible de déterminer si la séquence complémentaire de l'oligonucléotide antisens choisi existe dans un autre ARN messager (ou pré-messager), ou s'il existe une séquence qui ne diffère que par un, deux... nucléotides de la séquence choisie pour cible. Un calcul statistique simple montre qu'un oligonucléotide de 12 à 15 nucléotides de longueur ne devrait trouver, en moyenne, qu'une cible dans la population d'ARN messagers [1, 4]. Pour un oligonucléotide dont la cible serait l'ADN, par formation de triple hélice, la taille minimum devrait être choisie entre 15 et 19. Dans les deux cas, la longueur la

plus faible correspond à des oligonucléotides contenant uniquement des guanines (G) et des cytosines (C), alors que la longueur la plus élevée correspond à des oligonucléotides contenant des adénines (A) et des thymines (T). La différence tient au fait que le génome humain renferme plus de A et de T que de G et de C, la fraction de paires de bases A•T étant d'environ 0,6.

Faut-il utiliser des oligonucléotides longs pour assurer une meilleure spécificité ? L'énergie d'interaction perdue à cause d'un mésappariement conduit à une déstabilisation relative de plus en plus faible quand l'énergie totale de l'hybride formé, c'est-à-dire le nombre de paires de bases, augmente. Une étude récente sur l'oncogène *Ha-ras*, activé par une mutation ponctuelle sur le douzième codon (*figure 4*), démontre clairement ce phénomène. En utilisant la RNase H comme sonde pour mesurer la fixation de l'oligonucléotide sur sa cible, Saison-Behmoaras *et al.* trouvent qu'un dodéca- et un tridécanucléotide distinguent très bien l'ARN messager du proto-oncogène de celui de l'oncogène muté alors qu'un hexadécanucléotide ne fait plus de discrimination (*figure 5*). Mais si l'on réduit l'affinité globale de l'oligonucléotide pour sa cible, en remplaçant, par exemple, les groupes phosphates par des phosphorothioates, alors une bonne discrimination peut être obtenue avec des oligonucléotides plus longs (17-19 nucléotides pour des oligophosphorothioates interagissant avec l'ARN messager de l'oncogène *Ha-ras*) [12]. Ces résultats démontrent bien que c'est l'énergie relative du mésappariement, comparée à l'énergie totale de l'hybride, qui est le facteur contrôlant la sélectivité d'action vis-à-vis de deux cibles ne différant que par un seul nucléotide. Il faut cependant noter que la sélectivité n'est pas une propriété intrinsèque de l'oligonucléotide antisens. Elle dépend des conditions dans lesquelles se fait la fixation sur l'ARN cible et de la concentration de l'oligonucléotide. En effet, c'est la fraction de cible complexée à l'oligonucléotide qui détermine le taux d'inhibition de l'ARN cible ; il en est de même pour un ARN présen-

RÉFÉRENCES

46. Ratajczak MZ, Kant JA, Luger SM, Hijiya N, Zhang J, Zon G, Gewirtz AM. *In vivo* treatment of human leukemia in a scid mouse model with *c-myc* antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11823-7.

47. Kitajima I, Shinohara T, Bilakovics J, Brown DA, Xu X, Nerenberg M. Ablation of transplanted HTLV-I tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF- κ B. *Science* 1992; 258: 1792-5.

48. Higgins K, Perez JR, Coleman TA, Dorshkind K, McComas WA, Sarmiento UM, Rosen CA, Narayanan R. Antisense inhibition of the p65 subunit of NF- κ B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9901-5.

49. Wickstrom E, Bacon TA, Wickstrom EL. Down-regulation of c-MYC antigen expression in lymphocytes of E μ -*c-myc* transgenic mice treated with anti-*c-myc* DNA methylphosphonates. *Cancer Res* 1992; 52: 6741-5.

50. Tamsamani J, Tang JY, Padmapriya A, Kubert M, Agrawal S. Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of capped oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Antisense Res Dev* 1993; 3: 277-84.

51. Gray GD, Hernandez OM, Hebel D, Root M, Pow-Sang M, Wickstrom E. Antisense DNA inhibition of tumor growth induced by *c-Ha-ras* oncogene in nude mice. *Cancer Research* 1993; 53: 577-80.

52. Schwab G, Chavany C, Duroux I, Goubin G, Lebeau G, Hélène C, Saison-Behmoaras T. Antisense oligonucleotides stabilized by polyalkylcyanoacrylate nanoparticles specifically inhibit mutated *Ha-ras* mediated cell proliferation and tumorigenicity in nude mice (article soumis).

53. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 280-4.

54. Crooke RM, Hoke GD, Shoemaker EE. *In vitro* toxicological evaluation of ISIS 1082, a phosphorothioate oligonucleotide inhibitor of herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 527-32.

55. Cowser LM, Fox MC, Zon G, Mirabelli CK. *In vitro* evaluation of phosphorothioate oligonucleotides targeted to the E2 mRNA of papillomavirus: potential treatment for genital warts. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 171-7.

tant, par exemple, un ou plusieurs mésappariements. Un calcul thermodynamique simple montre qu'à l'équilibre, en présence d'un excès d'oligonucléotide par rapport à chacune des deux cibles, elles seront toutes les deux entièrement fixées à l'oligonucléotide et aucune discrimination ne sera observée. Si l'oligonucléotide est, au contraire, en quantité limitante par rapport à chacune des deux cibles, leurs taux de complexation respectifs seront dans le rapport des constantes de fixation de l'oligonucléotide. C'est dans ces

conditions que la discrimination sera la meilleure, mais le taux de couverture de la cible choisie sera faible. Seul un mécanisme catalytique permettra alors d'observer un effet biologique important. Par exemple, en utilisant un oligophosphorothioate de 17 nucléotides, Cazenave *et al.* ont démontré que la synthèse de β -globine pouvait être totalement inhibée, après micro-injection de l'ARN messager et de l'oligonucléotide dans des ovocytes de xénope, à des concentrations d'oligonucléotide (quelques nanomoles par litre) infé-

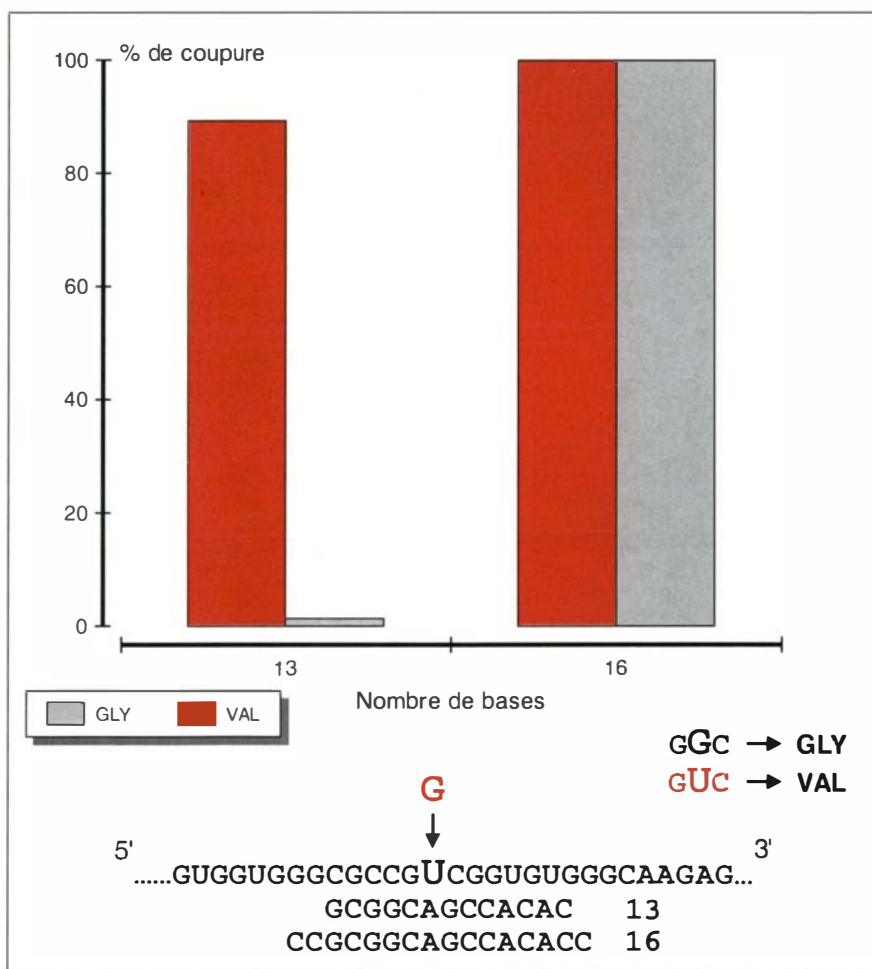


Figure 5. **Effet de la longueur de l'oligonucléotide antisens sur son efficacité.** Les ARN messagers *Ha-ras* codant pour la protéine normale (Gly) et l'oncoprotéine (Val) ont été mis en présence d'oligonucléotides antisens (13 et 16 nucléotides) dirigés contre l'ARN messager contenant la mutation ponctuelle (Val) et de la RNase H humaine. Après incubation à 37 °C, les coupures spécifiques induites sur les deux messagers ont été quantifiées. L'oligonucléotide de 13 résidus permet le clivage de l'ARN muté (en rouge) et non de l'ARN normal, alors que l'oligonucléotide de 16 résidus ne discrimine pas entre ces deux messagers, clivés l'un et l'autre. En effet, la coupure par la RNase H nécessite un hybride stable entre l'oligonucléotide et l'ARN, et un mésappariement sur 16 nucléotides est insuffisant pour compromettre la formation de cet hybride.

rieures à celle de l'ARN messager [36]. La RNase H endogène de l'ovocyte induit une coupure de l'ARN messenger hybridé à l'oligonucléotide. Celui-ci peut alors se détacher et se fixer à une autre molécule d'ARN dont il induit la coupure. L'oligonucléotide agit, dans ce cas, à des doses catalytiques. Si l'oligonucléotide était trop long, il resterait fixé à la cible, même après sa coupure par la RNase H, et ne pourrait donc pas agir comme catalyseur. C'est ce que l'on observe avec certains ribozymes dont la fixation sur la cible est trop forte, même après coupure, pour qu'ils puissent se détacher et aller attaquer une autre molécule d'ARN [37]. Aux considérations thermodynamiques évoquées ci-dessus, doivent donc être associées des considérations cinétiques, liées au temps de résidence de l'oligonucléotide sur son ARN cible et sur d'autres ARN, à la cinétique de fixation de la RNase H et à celle de la coupure enzymatique, aux accessibilités différentes de l'ARN cible et des ARN compétiteurs, etc. Dans tous les cas, la concentration choisie de l'oligonucléotide résultera d'un compromis entre l'efficacité (la cinétique) de l'effet recherché, et la sélectivité voulue vis-à-vis d'autres ARN. Les problèmes posés seront différents selon qu'il s'agira de faire une discrimination entre deux ARN ne différant que par une mutation ponctuelle (les oncogènes de la famille *ras*, par exemple) ou d'inhiber l'ARN messager d'un gène qui n'a pas d'homologues dans la cellule. Le choix d'un oligonucléotide court est indispensable dans le premier cas (*voir ci-dessus*) ; un oligonucléotide plus long pourra être utilisé dans le second cas, à condition qu'il manifeste son activité antisens à une concentration suffisamment faible et qu'il ne forme pas de structure secondaire par appariement intramoléculaire de bases. Dans la plupart des expériences décrites à ce jour les oligonucléotides choisis ont des tailles comprises entre 15 et 20 nucléotides.

Les autres cibles des oligonucléotides antisens

Toute présentation sur les oligonu-
m/s n° 3 vol. 10, mars 94

cléotides antisens repose sur l'axiome d'une fixation sélective d'un oligonucléotide sur l'ARN messager choisi pour cible. De nombreuses expériences démontrent pourtant que les oligonucléotides peuvent se fixer sur d'autres cibles cellulaires. Certains oligonucléotides peuvent se fixer sur l'ADN en formant une triple hélice [3, 4]. D'autres pourraient se fixer sur l'un des brins de l'ADN au sein de la région de la double hélice ouverte au cours de la réplication ou de la transcription [38]. La fixation d'oligonucléotides sur les ARN ou ADN polymérase a également été démontrée [27] ; l'inhibition des polymérase qui résulte de cette fixation dépend de la séquence de l'oligonucléotide. Placés dans un milieu de culture cellulaire, les oligonucléotides se fixent sur plusieurs protéines membranaires [26, 27]. Micro-injectés dans le cytoplasme d'une cellule, ils se concentrent très rapidement dans le noyau où ils établissent des interactions fortes (constantes de dissociation de quelques nanomol/l) avec un nombre important de protéines (environ 10⁶ sites par noyau) [39]. Des oligonucléotides peuvent même être sélectionnés pour se fixer de façon très sélective sur des protéines dont la fonction n'implique pas, *a priori*, d'acide nucléique [40]. C'est le cas, par exemple, de la thrombine. L'un des oligonucléotides sélectionnés pour se fixer sur cette protéine et inhiber son activité enzymatique (de séquence T₂G₂TGTC₂T₂), présente une structure tridimensionnelle particulière récemment caractérisée par RMN, et impliquant la formation de quadruplets de guanines [41].

Toutes ces données démontrent que des oligonucléotides antisens mis en contact avec des cellules pourraient avoir des effets secondaires inattendus, dus à leur fixation sur d'autres cibles cellulaires que le ou les ARN(s) messager(s) choisi(s) pour cible(s). Ce domaine demande à être exploré de façon plus détaillée dans le futur.

In vivo veritas

De nombreux exemples d'utilisation des oligonucléotides antisens sur des

cultures cellulaires ont été décrits. Ces oligonucléotides se révèlent être de puissants outils de laboratoire pour analyser le rôle joué par un gène particulier dans la physiologie cellulaire. Il serait trop long d'énumérer les exemples de telles applications. L'un des intérêts de la stratégie antisens est de fournir des outils pour analyser le rôle physiologique du produit d'un gène quand on ne dispose pas de mutant. Elle permet, en particulier, de distinguer les ARN messagers correspondant à des gènes homologues, par exemple à l'intérieur d'une famille multigénique. Deux ouvrages récents donnent une description détaillée, à la fois des problèmes de chimie et de pharmacologie et des exemples d'application à des cellules en culture [43, 44].

Il existe de nombreux cas pathologiques caractérisés par des altérations de séquence d'un ou de plusieurs gènes, notamment dans les tumeurs. Ces altérations créent des cibles spécifiques dans les cellules tumorales par comparaison avec les cellules normales (*figure 6*). Au cours de l'infection par un virus ou un parasite, l'information génétique propre au virus ou au parasite peut être aisément différenciée de celle de l'hôte. Dans la plupart des maladies, cependant, c'est le niveau d'expression d'un ou de plusieurs gènes qui est affecté. Les oligonucléotides antisens peuvent alors être utilisés pour rétablir un contrôle de l'expression génétique.

Les études au niveau de l'animal sont encore peu nombreuses. Quelques exemples sont présentés ci-dessous.

Inhibition de la croissance tumorale

Plusieurs publications décrivent l'effet d'oligonucléotides antisens sur la croissance tumorale dans des modèles animaux (*Tableau I*). Une lignée cellulaire (CHP-100) provenant d'un neuroblastome humain, soumise à l'action d'un oligonucléotide antisens (pentadécanucléotide non modifié), dirigé contre le gène *N-myc*, voit sa vitesse de croissance considérablement réduite [44]. Greffées chez la souris athymique, les cellules CHP-100 provoquent l'apparition de tumeurs au bout de deux

RÉFÉRENCES

56. Lisziewicz J, Sun D, Klotman M, Agrawal S, Zamecnik P, Gallo R. Specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by antisense oligonucleotides: an *in vitro* model for treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11209-13.

57. Lisziewicz J, Sun D, Metelev V, Zamecnik P, Gallo RC, Agrawal S. Long-term treatment of human immunodeficiency virus-infected cells with antisense oligonucleotide phosphorothioates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3860-4.

58. Offensperger WB, Offensperger S, Walter E, Teubner K, Igloi G, Blum HE, Gerok W. *In vivo* inhibition of duck hepatitis B virus replication and gene expression by phosphorothioate modified antisense oligodeoxynucleotides. *EMBO J* 1993; 12: 1257-62.

59. Verspieren P, Cornelissen AWCA, Thuong NT, Hélène C, Toulmé JJ. An acridine-linked oligodeoxynucleotide targeted to the common 5' end of trypanosome mRNAs kills cultured parasites. *Gene*, 1987; 61: 307-15.

60. Pascolo E, Blonski C, Shire D, Toulmé JJ. Antisense effect of oligodeoxynucleotides complementary to the mini-exon sequence of the protozoan parasite *Leishmania amazonensis*. *Biochimie* 1993; 75: 43-7.

61. Rapaport E, Misiura K, Agrawal S, Zamecnik P. Antimalarial activities of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8577-80.

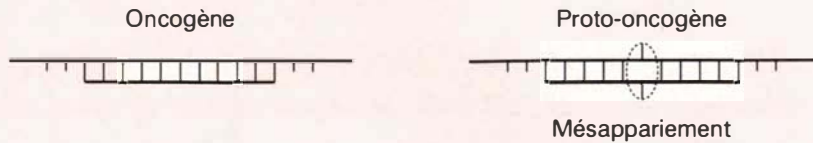
62. Bennett FC. Antisense oligonucleotides in inflammation research and therapeutics. In: Crooke ST, Lebleu B, eds. *Antisense Research and Applications*. New York: CRC Press Inc 1993; 32: 547-562.

63. Burch RM, Mahan LC. Oligonucleotides antisense to the interleukin 1 receptor mRNA block the effects of interleukin 1 in cultured murine and human fibroblasts and in mice. *J Clin Invest* 1991; 88: 1190-6.

64. Simons M, Edelman ER, De Keyser JL, Langer R, Rosenberg RD. Antisense *c-myc* oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation *in vivo*. *Nature* 1992; 359: 67-70.

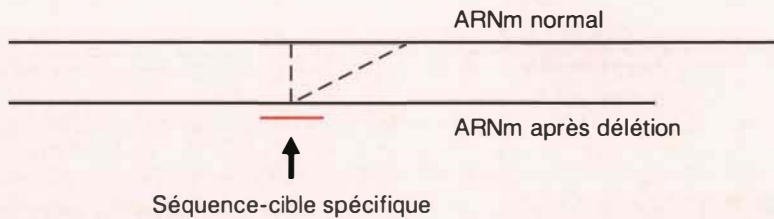
• Mutation ponctuelle

ex. : Mutation du gène *Ha-ras* au niveau du codon 12 (Gly → Val), carcinome humain de la vessie [90]



• Mutants de délétion

ex. : glioblastome [91]



• Translocation

ex. : *bcr-abl* dans les leucémies myéloïdes chroniques [68]



• Changement du site d'initiation de la transcription

ex. : *c-myc* dans les lymphomes de Burkitt (nouveau site promoteur dans le premier intron [92])

• Epissage alternatif

ex. : *EBNA-1* dans les carcinomes du nasopharynx [93]

Figure 6. **Discrimination entre proto-oncogène et oncogène par les oligonucléotides antisens.** De nombreux cas pathologiques sont caractérisés par des altérations de séquences d'un ou de plusieurs gènes, notamment les tumeurs. Ces altérations créent des cibles spécifiques dans les cellules tumorales par comparaison avec les cellules normales.

Tableau I				
EFFETS ANTITUMORAUX DES OLIGONUCLÉOTIDES ANTISENS				
Cellules cibles	Gènes cibles	Animal	Moyen d'administration	Oligonucléotide
Neuroblastome (CHP-100)	<i>N-myc</i>	Souris athymique	Sous-cutané, infusion continue	Phosphodiester [44] (15-mères)
Leucémie humaine (K562)	<i>c-myb</i>	Souris <i>scid</i>	Sous-cutané, perfusion continue	Phosphorothioate [46] (24-mères)
Cellules NIH 3T3 transformées	<i>Ha-ras</i>	Souris	Traitement des cellules par l'antisens avant injection à la souris	Phosphodiester [51] (15-mères)
Cellules épithéliales (HBL100) transformées par <i>Ha-ras</i>	<i>Ha-ras</i> muté (codon 12)	Souris athymique	Sous-cutané, injections répétées	Phosphodiester [52] (12-mères) adsorbé aux nanoparticules
Lymphocytes	<i>c-myc</i>	Souris transgéniques $E\mu$ - <i>myc</i>	Injection intraveineuse	Méthylphosphonate [49]
Fibrosarcomes murins (induits par HTLV-1 tax chez la souris transgénique)	- pour la sous-unité p65 du facteur de transcription NF κ B - tax HTLV1	Souris	Injection intrapéritonéale	Phosphodiester [47] (20-mères) avec 3 substitutions phosphorothioate aux extrémités 3'
Fibrosarcome (K-BALB) Mélanome (B-16)	pour la sous-unité p65 du facteur de transcription NK κ B	Souris athymique	Injections sous-cutanées Perfusion continue	Phosphorothioate [48] (18 à 24-mères)

semaines. Lorsque l'oligonucléotide antisens est délivré à la souris de façon continue (2,5 nmole/heure) pendant deux semaines (~ 4 mg au total) à proximité de la tumeur, à l'aide d'une pompe implantée dans le tissu sous-cutané, la croissance de la tumeur est ralentie de 50 %. L'expression du gène *N-myc* est bloquée alors que celle du gène *c-myc* n'est pas affectée. Un marqueur de différenciation neuroendocrine, la sécrétogranine I, disparaît au cours du traitement des tumeurs par l'oligonucléotide antisens, comme cela est observé lors du traitement des cellules en culture. Des changements morphologiques importants sont également observés dans les deux cas. Un oligonucléotide de contrôle n'exerce aucun de ces effets, ni sur les cellules en culture, ni sur les tumeurs greffées. Un arrêt du traitement avec l'oligonucléotide antisens pendant une semaine

annule son effet inhibiteur ; le gène *N-myc* s'exprime à nouveau et les tumeurs reprennent leur croissance, démontrant que l'effet est réversible malgré les changements observés dans la morphologie et l'état de différenciation. Il existe pourtant des cas où l'effet des oligonucléotides antisens sur des cellules en culture est irréversible. Par exemple, le traitement de cellules HL 60, une lignée promyélocytaire, par un oligonucléotide antisens dirigé contre l'oncogène *c-myc*, entraîne une différenciation des cellules vers la lignée granulocytaire [45].

Un oligophosphorothioate dirigé contre le proto-oncogène *c-myb* a été utilisé pour inhiber la multiplication de cellules leucémiques humaines (lignée K562) dans des souris *scid* [46]. La survie des souris est considérablement augmentée (un facteur 3,5) quand elles sont traitées par l'oligonucléotide antisens admi-

nistré de façon continue (1 μ l/heure) grâce à des minipompes implantées dans le tissu sous-cutané. La dose totale administrée est de 100 μ g/jour pendant 7 ou 14 jours. Plusieurs oligonucléotides de contrôle (dont un oligonucléotide ayant la même composition en bases) n'exercent aucun effet. Un oligonucléotide antisens dirigé contre le proto-oncogène *c-kit* est également dépourvu d'effet (les cellules K562 n'expriment pas ce gène).

Des souris transgéniques pour le gène *tax* du virus HTLV-I développent des fibrosarcomes au bout de neuf mois environ [47]. Des lignées cellulaires obtenues à partir de ces fibrosarcomes, transférées à des souris syngéniques (C57Bl/6), induisent la croissance rapide de tumeurs fibroblastiques. Un oligonucléotide antisens dirigé contre l'ARN messager du gène *tax* n'a aucun effet sur la croissance de ces cellules en cul-

RÉFÉRENCES

65. Osen-Sand A, Catsicas M, Staple JK, Jones KA, Ayla G, Knowles J, Grenningloh G, Catsicas S. Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Nature* 1993; 364: 445-8.
66. Wahlestedt C, Pich EM, Koob GF, Yee F, Heilig M. Modulation of anxiety and neuropeptide Y-Y1 receptors by antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 1993; 259: 528-31.
67. Wahlestedt C, Golanov E, Yamamoto S, Yee F, Ericson H, Yoo H, Inturrisi CE, Reis DJ. Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischaemic infarctions. *Nature* 1993; 363: 260-3.
68. Szczylik C, Skorski T, Nicolaidis NC, Manzella L, Malaguarnera L, Venturelli D, Gewirtz AM, Calabretta B. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 1991; 253: 562-5.
69. Agrawal S, Tang JY. An antisense oligonucleotide phosphorothioate as a therapeutic agent for AIDS. *Antisense Res Dev* 1992; 2: 261-6.
70. Bayever E, Iversen P, Smith L, Spinolo J, Zon G. Systemic human antisense therapy begins. *Antisense Res Dev* 1992; 2: 109-10.
71. Katsuki M, Sato M, Kimura M, Yokoyama M, Kobayashi K, Nomura T. Conversion of normal behavior to shiverer by myelin basic protein antisense cDNA in transgenic mice. *Science* 1988; 241: 593-5.
72. Moxham CM, Hod Y, Malbon CC. Induction of Gai2. Specific antisense RNA *in vivo* inhibits neonatal growth. *Science* 1993; 260: 991-5.
73. Chatterjee S, Johnson PR, Wong KK. Dual-target inhibition of HIV-1 *in vitro* by means of an adeno-associated virus antisense vector. *Science* 1992; 258: 1485-7.
74. Sullenger BA, Cech TR. Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* 1993; 262: 1566-9.
75. Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, Sasazuki T. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated *ki-ras*. *Science* 1993; 260: 85-8.
76. Mukhopadhyay T, Tainsky M, Cavanaugh AC, Roth JA. Specific inhibition of *Ki-ras* expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer Res* 1991; 51: 1744-8.
- ture, bien que le niveau d'expression du gène *tax* soit réduit de plus de 90 %. En revanche, des oligonucléotides dirigés contre les ARN messagers des sous-unités p65 et p50 du facteur de transcription NFκB inhibent la croissance de ces lignées. Injecté par voie intrapéritonéale (3 injections à 3 jours d'intervalle, 40 µg/g pour chaque injection), l'oligonucléotide anti-p65 (20-mère avec trois liaisons phosphorothioates du côté 3') entraîne une régression des tumeurs obtenues par greffe de cellules de fibrosarcomes sur des souris syngéniques. Les souris non traitées, ou traitées par des oligonucléotides de contrôle, meurent au bout de huit à douze semaines, alors que les souris traitées par l'oligonucléotide antisens ne présentent aucune trace de tumeur cinq mois après le traitement effectué seulement pendant les neuf premiers jours. L'oligonucléotide anti-*tax* n'exerce aucun effet sur la croissance des tumeurs chez la souris, bien que cet oligonucléotide entraîne une inhibition quasi complète de l'expression du gène *tax* dans les tumeurs, comme dans les cellules en culture.
- Des oligophosphorothioates (18-24 nucléotides de longueur) ont également été utilisés pour inhiber la croissance de tumeurs chez des souris athymiques [48]. Les oligomères ont été injectés, soit par voie sous-cutanée (1,4 mg par injection, deux injections par semaine pendant deux semaines), soit à l'aide d'une mini-pompe implantée (2,8 mg d'oligonucléotide délivrés en 14 jours). Ces oligonucléotides étaient dirigés contre l'ARN messager (au voisinage du codon d'initiation) de la sous-unité p65 du facteur de transcription NFκB. Deux lignées de tumeurs murines ont été utilisées: κ-BALB (fibrosarcome) et B16 (mélanomes). Dans les deux cas, l'oligonucléotide antisens bloque la formation de tumeurs alors que l'oligonucléotide sens n'a aucun effet. Un oligonucléotide antisens dirigé contre la sous-unité p50 du facteur NFκB s'est révélé inactif. L'expression de l'ARN messager de la protéine p65 et celle du complexe NFκB sont considérablement inhibées dans les cellules traitées par l'oligonucléotide anti-p65.
- Des souris transgéniques, exprimant le gène *c-myc* sous le contrôle de la région activatrice (Eμ) des gènes codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines, ont été utilisées pour étudier l'effet d'un oligométhylphosphonate dirigé contre les cinq premiers codons de l'ARN messager du gène *c-myc* [49]. L'oligonucléotide a été injecté par voie intraveineuse (300 nanomoles, soit 1,5 mg) et l'expression du gène *c-myc* mesurée trois à quatre heures après l'injection. Une inhibition du taux de protéine Myc a été observée après traitement avec l'oligonucléotide antisens, mais pas avec l'oligonucléotide de contrôle (séquence « brouillée »). Le taux d'ARN messager *c-myc* n'a pas été affecté, un résultat en accord avec l'absence d'activité RNase H sur les hybrides oligométhylphosphonate/RNA. Aucune toxicité aiguë n'a été détectée chez les souris traitées par un oligométhylphosphonate à la dose de 50 à 75 mg/kg. Une diminution rapide de la concentration plasmatique a été observée (> 90 % en une heure) suivie d'une phase plus lente d'élimination. Ces résultats sont voisins de ceux observés avec des oligophosphorothioates et des oligodésoxynucléotides protégés à leur extrémité 3' [50]. Plusieurs études ont montré qu'une fraction de l'oligonucléotide se retrouvait dans tous les organes, à l'exception du cerveau. Gray *et al.* ont utilisé un oligodésoxynucléotide dirigé contre la région 5' non codante de l'ARN messager du gène *Ha-ras* [51]. Des cellules NIH 3T3 transformées par l'oncogène *Ha-ras* muté au niveau du codon 12 ont été traitées par l'oligonucléotide antisens pendant trois jours, puis greffées à des souris athymiques. Le traitement *in vitro* inhibe considérablement la croissance des cellules tumorales injectées chez la souris tandis qu'un oligonucléotide témoin n'exerce aucun effet inhibiteur sur le développement des tumeurs. En collaboration avec l'équipe de Goubin à l'Institut Curie, notre laboratoire a étudié l'effet d'un dodécadésoxynucléotide antisens dirigé contre l'oncogène *Ha-ras* muté (au niveau du 12^e codon) sur des tumeurs greffées chez la souris athymique (*nude mice*) [52]. Des cellules humaines provenant d'un épithé-

lium mammaire (HBL 100) ont été transformées par l'oncogène *Ha-ras* portant la mutation 12. Ces cellules, greffées en sous-cutané à des souris athymiques, provoquent l'apparition de tumeurs en deux à trois semaines. L'oligodésoxynucléotide centré sur la mutation, complémentaire du gène muté, a été injecté par voie sous-cutanée (une injection tous les trois jours pendant trois semaines) en présence de nanoparticules. Ces nanoparticules, d'un diamètre de 120 nm environ, sont constituées par un polymère hydrophobe (polyalkylcyanoacrylate), dans lequel sont incorporés des cations hydrophobes pour permettre la fixation de l'oligonucléotide chargé négativement. L'adsorption de l'oligonucléotide sur les nanoparticules le rend résistant aux nucléases et permet de réduire d'un facteur 100 environ la concentration nécessaire pour inhiber la prolifération des cellules tumorales HBL 100-*ras* en culture cellulaire (figure 7). Une dose totale de 50 à 100 µg d'oligonucléotide antisens injecté aux souris empêche le développement des tumeurs, alors qu'un oligonucléotide de séquence inver-

sée n'a aucun effet. Dans une autre série d'expériences, les oligonucléotides associés aux nanoparticules ont été injectés directement dans la tumeur. Une régression des tumeurs a été observée avec l'antisens alors que les tumeurs continuent de croître avec l'oligomère de séquence inversée.

Activité antivirale des oligonucléotides antisens

De nombreuses expériences ont décrit l'effet inhibiteur d'oligonucléotides antisens sur des cultures cellulaires infectées par des virus. La première expérience décrivant l'effet antisens d'un oligonucléotide a d'ailleurs été réalisée sur un virus, le virus du sarcome de Rous (RSV) [53]. Un oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 5' et 3' (séquence répétée) de l'ARN viral inhibe le développement du RSV en culture cellulaire.

Un oligonucléotide dirigé contre l'extrémité commune des huit ARN du virus de la grippe de type A inhibe l'effet cytopathogène du virus sur des cellules MDCK en cul-

ture [30]. Les virus de type B, qui ne possèdent pas exactement la même séquence à l'extrémité 5' de leurs ARN, continuent à exercer leur effet cytopathogène. Cette expérience démontre la sélectivité de l'effet antisens puisque les mésappariements avec les ARN de type B déstabilisent les complexes formés et annulent l'effet antisens. Il faut noter que l'oligonucléotide antisens utilisé dans ces expériences était substitué par un agent intercalant en position 3'. Cette substitution joue un triple rôle : elle augmente la stabilité du complexe formé avec la séquence complémentaire ; elle protège l'oligonucléotide dans les cultures cellulaires contre la dégradation par les 3'-exonucléases ; elle facilite la pénétration de l'oligonucléotide dans les cellules.

Le virus de l'herpès (HSV1) a également été la cible d'oligonucléotides antisens dirigés, soit contre le site d'épissage de deux ARN pré-messagers précoces du virus, soit contre un gène de régulation. Dans le premier cas, des oligométhylphosphonates [20] et des oligonucléotides en série α [23], substitués par un dérivé du psoralène, ont été utilisés pour inhiber le développement viral en présence de lumière UV. Dans le second cas, des oligonucléotides avec un squelette phosphodiester naturel ou des phosphorothioates se sont révélés actifs pour inhiber la croissance virale [54]. Des oligonucléotides dirigés contre le virus du papillome inhibent également la multiplication de ce virus [55].

De nombreux oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARN du VIH ont été étudiés pour leur effet inhibiteur sur le développement de ce virus dans des cellules en culture [55-57]. L'accent a surtout été mis sur des dérivés phosphorothioates dont le mécanisme d'action s'avère complexe [28]. Ces oligonucléotides peuvent en effet se fixer sur la protéine d'enveloppe gp120 du virus et sur le récepteur CD4 des lymphocytes T4. Ils inhibent ainsi la première étape d'adsorption du virus et de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Ils se fixent également sur la transcriptase inverse et inhibent son activité enzymatique. Enfin, ils peuvent

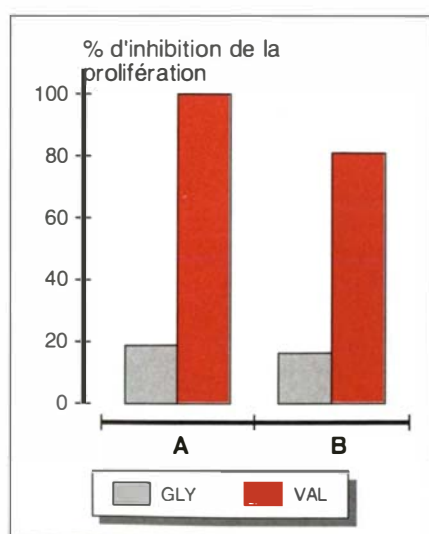


Figure 7. **Adsorption des oligonucléotides sur des nanoparticules.**

Les cellules épithéliales transformées par l'oncogène *Ha-ras* (HBL 100 *ras* 1) ont été mises en culture pendant 20 heures, soit en présence de 20 µM d'un dodécadésoxynucléotide dirigé contre le gène *Ha-ras* muté (Val) ou sauvage (Gly) (B), soit en présence de 200 nM des mêmes oligonucléotides adsorbés aux nanoparticules (A). L'adsorption de l'oligonucléotide sur des nanoparticules de polymère hydrophobe polyalkylcyanoacrylate le rend résistant aux nucléases et permet de réduire d'un facteur 100 environ la concentration nécessaire pour inhiber la prolifération des cellules tumorales.

RÉFÉRENCES

77. Trojan J, Johnson TR, Rudin SD, Ilan J, Tykocinski ML, Ilan J. Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA. *Science* 1993; 259: 94-7.
78. Potts JD, Dagle JM, Walder JA, Weeks DL, Runyan RB. Epithelial-mesenchymal transformation of embryonic cardiac endothelial cells is inhibited by a modified antisense oligodeoxynucleotide to transforming growth factor β 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1516-20.
79. Cardoso AA, Li ML, Batard P, Hatzfeld A, Brown EL, Levesque JP, Sookdeo H, Panterne B, Clark SC, Hatzfeld J. Release from quiescence of CD34⁺CD38⁻ human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, (sous presse).
80. Crooke ST. Regulatory issues affecting oligonucleotides. *Antisense Res Dev* 1993; 3: 301-6.
81. Therre H. Une thérapie pour demain. *Biofutur mars* 1992: 25-32.
82. Kahn A. *Thérapie génique: l'ADN médicament*. Paris: John Libbey Eurotext, 1993: 172 p.
83. Degols G, Devaux C, Lebleu B. Oligonucleotide-poly(L-lysine)-heparin complexes: potent sequence-specific inhibitors of HIV-1 infection. *Bioconjug Chemistry* 1994, (sous presse).
84. Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raymond J, Mayer R, Monsigny M, Roche AC. Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 871-8.
85. De Smidt PC, Le Doan T, De Falco F, Van Berkel T. Association of antisense oligonucleotides with lipoproteins prolongs the plasma half-life and modifies the tissue distribution. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4695-700.
- exercer une activité antisens en se fixant, soit sur l'ARN viral, soit sur les ARN messagers du virus. Seul le mécanisme antisens est strictement spécifique de la séquence de l'oligonucléotide, bien que la fixation sur les autres cibles dépende également de la séquence, les oligonucléotides riches en cytosine étant plus efficaces dans les deux premiers mécanismes. L'activité antisens a été démontrée sur des cellules chroniquement infectées où les deux premiers mécanismes ne jouent pas un rôle important. En utilisant des oligonucléotides (phosphodiester) conjugués à la polylysine, Lebleu *et al.* ont également démontré la sélectivité de l'effet antisens en comparant deux souches virales présentant des différences de séquence dans la région choisie pour cible (gène *tal*) [33]. La conjugaison des oligonucléotides à la polylysine conduit à une pénétration cellulaire accrue de l'oligonucléotide et évite les effets dus à la fixation des oligonucléotides sur d'autres cibles que les ARN du virus. En traitant des cellules infectées par le VIH-1 deux fois par semaine avec des oligonucléotides phosphorothioates antisens dirigés contre les gènes *rev* et *gag*, la réplication du virus a pu être bloquée pendant une durée supérieure à quatre-vingts jours [57]. La concentration d'oligonucléotide requise pour maintenir l'inhibition de la réplication virale peut être diminuée en cours de traitement. Bien qu'il existe de nombreuses études au niveau cellulaire, il existe peu d'essais d'oligonucléotides antisens contre des virus *in vivo*. Des oligométhylphosphonates conjugués au psoralène, dirigés contre le virus de l'herpès, et appliqués localement sur l'oreille de souris, entraînent une réduction de l'infection après irradiation UV. Il faut noter que le même oligomère, utilisé sur des cultures cellulaires, ne réduit pas le titre viral au-delà de 90 % à 95 % [21]. Des études sur le virus de l'encéphalite porté par les tiques en Sibérie ont été conduites chez la souris. Un effet antiviral d'oligonucléotides a bien été observé mais il ne semble pas être dépendant de la séquence utilisée (Vlassov, communication personnelle). Le seul résultat démontrant clairement un effet antiviral d'oligonucléotides antisens chez l'animal est celui récemment publié par Offensperger *et al.* sur le virus de l'hépatite B du canard (DHBV) [58]. Un oligophosphorothioate dirigé contre l'extrémité 5' du gène pré-S du virus inhibe la réplication virale et l'expression des gènes du virus à la fois *in vitro* dans des hépatocytes primaires en culture cellulaire et *in vivo* chez le canard. Deux semaines après l'infection, les canards ont reçu une injection intraveineuse journalière d'oligonucléotide (5 à 20 mg/kg). Après dix jours de traitement à la plus forte dose, l'ADN viral n'est plus détectable dans les cellules hépatiques et les antigènes viraux disparaissent du sérum et du foie. Dans une autre série d'expériences, des canards prétraités par l'oligonucléotide antisens se sont montrés résistants à une infection par le virus. Deux oligonucléotides de contrôle se sont révélés inactifs aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Antisens et parasites

Certains parasites comme les trypanosomes ou les leishmanies constituent des cibles intéressantes pour la stratégie antisens. En effet, les ARN messagers de ces parasites possèdent la propriété d'avoir une séquence commune à leur extrémité 5'. Cette séquence provient d'une réaction d'épissage en *trans* utilisant comme donneur un ARN de 90 nucléotides environ obtenu par transcription d'un gène spécifique du parasite. La séquence commune ainsi obtenue est de 39 nucléotides chez *Leishmania* et de 37 nucléotides chez *Trypanosoma*. Un oligonucléotide complémentaire de cette région commune est donc susceptible d'inhiber la traduction de l'ensemble des messages du parasite. Cette approche a été utilisée avec succès sur *Trypanosoma brucei* en culture en utilisant un conjugué nonanucléotide-intercalant [59] et plus récemment sur *Leishmania amazonensis* dans des macrophages en utilisant des oligophosphorothioates [60]. Des oligophosphorothioates dirigés contre le gène de la dihydrofolate reductase-thymidylate synthase de *Plasmodium falciparum* ont démontré une activité inhibitrice sur la crois-

sance du parasite dans des érythrocytes humains [61]. Le même effet est observé sur les souches sensibles et résistantes à la chloroquine. Bien que les érythrocytes humains laissent difficilement entrer des oligonucléotides, l'infection par *P. falciparum* permet une pénétration mesurable. Ces résultats sont sans doute à rapprocher du cas des infections virales où il est tout à fait possible que l'infection virale modifie la pénétration des oligonucléotides antisens dans les cellules.

Il n'existe pas encore d'études de l'effet antiparasitaire d'oligonucléotides antisens sur des modèles animaux. Comme dans les approches antivirales, l'un des intérêts de la stratégie antisens repose sur la sélectivité qu'il est possible d'espérer en s'attaquant de façon spécifique à l'information génétique du parasite sans affecter celle de l'hôte. Elle se heurte néanmoins à des difficultés particulières dues aux multiples formes du parasite lors de son développement et à l'existence de barrières supplémentaires à franchir.

Antisens et inflammation

De nombreuses expériences utilisant des cultures cellulaires ont démontré l'efficacité et la sélectivité d'oligonucléotides antisens dirigés contre des cytokines, des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des molécules d'adhérence, des enzymes de biosynthèse des médiateurs de l'inflammation... (voir [62] pour une revue récente). Il existe cependant peu d'exemples d'applications de la stratégie antisens *in vivo*. Burch et Mahan [63] ont montré qu'un antisens dirigé contre le récepteur de l'interleukine 1 (IL1-R) inhibe la synthèse de prostaglandines (PGE₂) stimulée par fixation de IL1, alors que l'effet du TNF ou de la bradykinine n'est pas affecté. Aucun changement dans le nombre de récepteurs de la bradykinine n'est observé alors que celui des récepteurs d'IL1 diminue considérablement après traitement par l'oligonucléotide antisens. L'oligonucléotide dirigé contre le récepteur murin n'inhibe pas le récepteur humain et *vice versa*. L'encapsulation dans des liposomes augmente considérablement l'effet de ces oligonucléotides antisens.

Une injection sous-cutanée de l'oligonucléotide antisens (phosphorothioate) anti-IL1-R murin, chez la souris, conduit à une réduction de l'infiltration de neutrophiles consécutive à une injection d'IL1 au même site. L'antisens dirigé contre IL1-R humain n'a pas d'effet. Cette expérience, probablement la première démontrant une activité biologique d'un oligonucléotide chez l'animal, permet de penser que les oligonucléotides antisens pourraient connaître un développement important dans la recherche d'inhibiteurs spécifiques de l'inflammation.

Antisens et resténose

Les dommages de la paroi artérielle sont connus pour entraîner la synthèse ou le relargage d'agents mitogènes qui induisent une prolifération et une migration de cellules musculaires lisses. L'expression des gènes *c-myb* et *c-myc* est un événement précoce résultant de ces stimulations. Leur inhibition par des oligonucléotides antisens constitue donc une approche possible pour inhiber ces phénomènes.

Un oligophosphorothioate antisens, dirigé contre le gène *c-myb* (18-mère, position 4-22 du gène *c-myb* murin), a été utilisé pour inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses (SMC) après angioplastie de l'artère carotide [64]. L'oligonucléotide a été appliqué sous forme de gel (pluronic F 127) autour de l'artère carotide. Deux semaines après l'angioplastie, l'expression du gène *c-myb* était considérablement réduite et la prolifération des cellules musculaires lisses fortement inhibée. L'effet est localisé à la région de l'artère où l'oligonucléotide a été appliqué. Deux oligonucléotides de contrôle (un oligonucléotide sens et un oligonucléotide présentant deux mésappariements) n'ont pas inhibé la prolifération des cellules musculaires lisses qui conduit au phénomène de resténose. Chez le lapin, l'injection d'un oligophosphorothioate antisens, dirigé contre *c-myb*, réduit la croissance des cellules musculaires lisses de l'artère iliaque deux mois après le traitement.

Les expériences décrites sur le rat et le lapin démontrent qu'une administration locale d'oligonucléotides

antisens pourrait être envisagée pour inhiber l'accumulation des cellules musculaires lisses dans la lumière artérielle, par exemple lors d'une angioplastie.

Antisens et système nerveux

Quelques expériences décrivent l'effet d'oligonucléotides antisens dans des cellules nerveuses. Il existe cependant peu d'études *in vivo*. Récemment, des oligophosphorothioates ont été dirigés contre l'ARN messager de la protéine SNAP-25 (*synaptosomal associated protein*), une protéine spécifiquement exprimée dans les neurones [65]. Deux antisens complémentaires des séquences 1-20 et 533-552 (le site d'initiation de la traduction étant choisi comme référence) inhibent l'élongation des neurites de cellules en culture. Cette inhibition de la croissance axonale est également observée lorsque l'un des oligonucléotides antisens est injecté dans l'œil d'embryons de poulets et la rétine examinée deux jours après l'injection. La protéine SNAP-25 possède deux isoformes qui proviennent d'un épissage alternatif et qui sont exprimées à des périodes différentes au cours du développement. Les oligonucléotides antisens utilisés dans l'étude décrite ci-dessus étaient dirigés contre des régions communes aux deux isoformes. La sélectivité de l'effet antisens devrait permettre d'analyser les effets respectifs des deux isoformes sur la croissance axonale et l'exocytose à partir des vésicules synaptiques.

Une autre étude récente a permis de préciser le rôle des deux classes de récepteurs (NPY-Y1 et NPY-Y2) du neuropeptide Y (NPY) dans le déclenchement des phénomènes d'anxiété chez le rat [66]. Dans des cultures de neurones corticaux de rat un oligonucléotide antisens (phosphodiester), dirigé contre l'ARN messager du récepteur NPY-Y1 (qui fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G), bloque l'expression de ce récepteur alors qu'il est sans effet sur le récepteur NPY-Y2. Le même oligonucléotide a été injecté dans le ventricule cérébral latéral de rats. Une étude comportementale a montré que la diminution de la concentration du

RÉFÉRENCES

86. Bonfils E, Depierreux C, Midoux P, Thuong NT, Monsigny M, Roche AC. Drug targeting: synthesis and endocytosis of oligonucleotide-neoglycoprotein conjugates. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 4621-9.
87. Juliano RL, Akhtar S. Liposomes as a drug delivery system for antisense oligonucleotides. *Antisense Res Dev* 1992; 2: 165-76.
88. Leonetti JP, Leserman LD. Targeted delivery of oligonucleotides. In: Crookes ST, Lebleu B, eds. *Antisense Res Applic*. New York: CRC Press Inc, 1993: 493-504.
89. Chavany C, Le Doan G, Couvreur P, Puisieux F, Hélène C. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides. *Pharm Res* 1992; 9: 441-9.
90. Saison-Behmoaras T, Tocqué B, Rey I, Chassignol M, Thuong NT, Hélène C. Short modified antisense oligonucleotides directed against Ha-ras point mutation induce selective cleavage of the mRNA and inhibit T24 cells proliferation. *EMBO J* 1991; 10: 1111-8.
91. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, Bigner DD. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4207-11.
92. McManaway ME, Neckers LM, Loke SL, Al-Nasser AA, Redner RL, Shiramizu BT, Goldschmidt WL, Huber BE, Dhatia K, Magrath IT. Tumour-specific inhibition of lymphoma growth by an antisense oligonucleotide. *Lancet* 1990; 335: 808-11.
93. Smith PR, Griffin BE. Transcription of the Epstein-Barr virus gene EBNA-1 from different promoters in nasopharyngeal carcinoma and B lymphoblastoid cells. *J Virol* 1992; 66: 706-14.
94. Boiziau C, Thuong NT, Toulmé JJ. Mechanisms of the inhibition of reverse transcription by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 768-72.
- récepteur NPY-Y1 était associée à un accroissement de l'anxiété. Les animaux traités par un oligonucléotide de contrôle ne présentent aucune différence avec les animaux non traités. Il peut être surprenant que des oligonucléotides non protégés se soient révélés actifs dans ce modèle animal. Ce résultat est sans doute à relier à la faible activité des nucléases dans le cerveau et dans le liquide céphalo-rachidien. La spécificité d'action des oligonucléotides antisens pourrait donc trouver une application intéressante dans l'étude du rôle joué par différents récepteurs d'une même famille, surtout lorsque aucun antagoniste sélectif n'est disponible.
- Un oligonucléotide antisens de 18 nucléotides (phosphodiester naturel), dirigé contre une séquence immédiatement en aval du codon d'initiation de l'ARN messager du gène codant pour le récepteur R1 du N-méthyl-D-aspartate (NMDA-R1), inhibe la biosynthèse de ce récepteur dans les neurones [67]. L'administration intracérébroventriculaire de cet oligonucléotide à des rats, (~ 0,4 mg en quatre fois sur deux jours), réduit le volume de l'infarctus ischémique produit par occlusion de l'artère cérébrale médiane. Un oligonucléotide sens, utilisé comme contrôle, n'a pas démontré d'effet en utilisant le même protocole. L'effet d'un agent bloquant le récepteur NMDA de façon non compétitive (MK801), injecté par voie intraveineuse à une dose de 1 mg.kg⁻¹, est moindre que celui de l'oligonucléotide antisens. Un oligophosphorothioate antisens administré de façon continue par une mini-pompe osmotique (~ 0,5 mg en 72 heures) réduit le nombre de sites de fixation du NMDA comme le fait l'oligonucléotide synthétisé avec un enchaînement phosphodiester naturel lorsqu'il est administré par voie intracérébroventriculaire.

Essais cliniques utilisant des oligonucléotides antisens

Les études pharmacocinétiques et toxicologiques chez l'animal ont

démonstré qu'il était possible d'envisager une extrapolation à l'homme de la stratégie antisens faisant appel à des oligophosphorothioates et des oligométhylphosphonates. Plusieurs essais cliniques sont actuellement prévus. Des oligonucléotides (phosphorothioates et méthylphosphonates) dirigés contre la jonction des deux messages *bcr* et *abl* dans l'ARN messager « chimère » provenant de la translocation 14-22 dans les leucémies myéloïdes chroniques seront utilisés dans des traitements *in vitro* de moelle osseuse afin de la purger des cellules transformées [68]. Une greffe de moelle après ce traitement permet d'espérer un repeuplement du système lymphocytaire par les cellules non transformées.

Un oligophosphorothioate dirigé contre le gène *gag* du VIH-1 [69] vient d'entrer en phase clinique en France dans le cadre des actions menées par l'ANRS (Agence nationale de recherche sur le SIDA). Une demande d'autorisation d'essais cliniques a également été déposée aux États-Unis pour ce même oligonucléotide. Comme nous l'avons déjà mentionné, les oligophosphorothioates agissent sur plusieurs cibles quand le VIH-1 infecte des cellules en culture: CD4, gp120, transcriptase inverse, ARN viral, ARN messager. Les études cliniques permettront de déterminer quelles cibles sont les plus importantes et le rôle joué par l'effet spécifique de séquence (effet antisens).

Un oligophosphorothioate dirigé contre l'ARN messager du gène *p53* humain est entré en phase d'essais cliniques à l'université du Nebraska aux États-Unis [70]. Cet oligonucléotide avait été initialement conçu pour inhiber l'expression du gène *p53* à une époque où les chercheurs pensaient que ce gène était un oncogène. La démonstration ultérieure que ce gène est en fait un gène suppresseur de tumeurs (« anti-oncogène ») pourrait laisser supposer que l'approche antisens n'était certainement pas appropriée. Cependant, les mutations du gène *p53* dans un grand nombre de tumeurs entraînent l'apparition de mutants *trans*-dominants, ce qui redonne un intérêt à la stratégie antisens. Des cellules tumorales pro-

Tableau II
 QUELQUES RÉFÉRENCES RÉCENTES
 SUR LES TRANSPORTEURS ET VECTEURS
 D'OLIGONUCLÉOTIDES ANTISENS

	Références
Polylysine	[30, 33]
Polylysine/héparine	[83]
Polypeptides glycosylés et gluconoylés	[84]
Lipoprotéines (LDL)	[85]
Néoglycoprotéines	[86]
Liposomes	[87, 88]
Immunoliposomes	[88]
Nanoparticules	[89]

venant de leucémies myéloblastiques aiguës voient leur prolifération arrêtée par un oligonucléotide antisens dirigé contre $\beta 53$ (séquence cible dans l'exon 10). Aucun effet n'a été observé sur la croissance de cellules de moelle osseuse. Des effets réversibles ont été obtenus sur des cellules épithéliales intestinales ou sur des lymphocytes T. Aucun effet toxique n'a été observé chez le singe rhésus. Un premier essai clinique à une dose de 0,05 mg/kg/heure pendant dix jours a été décrit [70]. Des essais thérapeutiques dans le cas d'infections virales (herpès, papillomes) sont également en cours en utilisant des oligophosphorothioates en application locale [42].

Les oligophosphorothioates ne représentent que la première génération d'oligonucléotides antisens. Le démarrage d'essais thérapeutiques est justifié dans les affections pour lesquelles il n'existe pas de thérapie adéquate. Les nouvelles générations de molécules plus actives et plus spécifiques qui sont actuellement en développement devraient prendre le relais dans un avenir proche. Des progrès importants sont également à attendre sur la vectorisation de ces nouvelles substances actives (Tableau II).

Antisens et thérapie génique

L'expression d'ARN antisens et de ribozymes dans des cellules vivantes grâce à des vecteurs ADN ouvre la possibilité de développer ces technologies dans le cadre de la thérapie génique. Il existe relativement peu

d'exemples d'utilisation de modèles de souris transgéniques pour étudier l'effet physiologique, et potentiellement pathologique, du blocage de l'expression d'un gène par un transgène antisens. Une construction antisens dirigée contre le gène de la protéine basique de la myéline reproduit le phénotype *shiverer* chez des souris transgéniques pour cet antisens [71]. Une construction antisens dirigée contre l'une des protéines G ($G\alpha i2$), sous le contrôle du promoteur de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), conduit à un développement anormal des tissus exprimant normalement la PEPCK (tissu adipeux et foie essentiellement) et à des déficits métaboliques importants limitant la croissance des animaux [70].

Antisens et ribozymes dirigés contre VIH

Une série d'études récentes ayant l'ARN viral et/ou les ARN messagers du VIH comme cibles a montré l'intérêt d'une approche de thérapie génique utilisant la stratégie antisens ou ribozyme. Une construction antisens, dirigée contre les séquences 13-75 (*TAR*) et 9096-9160 (incluant le signal de polyadénylation) du VIH-1 a été exprimée à l'aide d'un vecteur viral (*adeno-associated virus*, AAV) dans différentes lignées cellulaires [73]. L'expression de l'ARN antisens s'accompagne d'une réduction supérieure à quatre ordres de grandeur de la production de particules virales infectieuses vingt jours après l'infection des cellules (CEM ou H9). Le virus AAV s'intègre dans

le génome de la cellule hôte. Mais des résultats semblables ont été obtenus par transfection d'un vecteur plasmidique. Le mécanisme d'action de l'ARN antisens n'est pas encore clairement établi. Les cellules infectées par la construction AAV-antisens expriment l'ARN antisens; après infection par le VIH la concentration d'ARN viraux est considérablement réduite et celle de l'ARN antisens n'est plus détectable. Il est possible que le double brin ARN/ARN antisens soit dégradé par des nucléases cellulaires mais on ne peut exclure que les ARN antisens et viraux agissent par réaction croisée au niveau de la transcription des gènes correspondants. Quel que soit le mécanisme d'inhibition, ces résultats ouvrent la perspective d'utiliser des cellules souches infectées par le vecteur AAV-antisens pour repeupler le système immunitaire avec des cellules résistantes à l'infection par VIH.

Un ribozyme a été synthétisé pour reconnaître et couper la séquence 5' présente dans tous les ARN du VIH-1 HxB2, la coupure ayant lieu à la position 111-112 par rapport au site d'initiation de la transcription pris pour référence (+ 1) [9]. Ce ribozyme est efficace et spécifique *in vitro*. Dans des cellules HeLa, après co-transfection de l'ADN proviral de VIH-1 et d'un vecteur exprimant le ribozyme sous le contrôle du promoteur de la β -actine, l'expression des gènes *p24* et *tal* est fortement réduite (70 % à 80 %). Un mutant du ribozyme qui peut encore se fixer sur les ARN, mais n'a plus d'activité hydrolytique, n'a pratiquement plus d'effet (10 %) démontrant que c'est l'activité ribozyme et non antisens qui est importante. Des ribozymes de structure différente ont également démontré leur efficacité pour inhiber l'expression des ARN messagers du VIH. Récemment, les deux approches antisens et ribozyme ont été conjuguées en construisant un vecteur exprimant un ARN antisens de 413 nucléotides dirigé contre la région 222-634 du VIH (5'-*leader/gag*), dans lequel une structure ribozyme a été incorporée [7]. L'ARN chimère ainsi obtenu est quatre à sept fois plus efficace que l'antisens pour inhiber la

réplication du VIH-1. Dans tous les cas, l'effet inhibiteur observé est loin d'être 100 %, ce qui peut refléter, comme dans le cas des ARN antisens, l'inaccessibilité d'une sous-population des ARN choisis pour cibles. Il est possible d'associer des ribozymes dirigés contre des cibles différentes du virus dans la même construction génétique, dans le but d'augmenter l'efficacité de l'inhibition des fonctions virales. Une autre approche consiste à introduire dans l'ARN portant le ribozyme une séquence permettant de l'introduire dans les particules virales en cours de formation [74]. Cette colocalisation du ribozyme avec sa cible entraîne une efficacité accrue de l'hydrolyse de l'ARN viral.

Les résultats actuellement disponibles démontrent que les stratégies antisens et ribozymes sont certainement envisageables dans le cadre d'une approche de thérapie génique destinée à lutter contre l'infection par le VIH. Il reste beaucoup de travail fondamental à réaliser pour déterminer la meilleure cible, à la fois pour des ARN antisens et des ribozymes. Les résultats obtenus avec le vecteur AAV (*voir ci-dessus*) suggèrent que la région TAR et le signal de polyadénylation, utilisés simultanément, pourraient constituer d'excellentes cibles.

Antisens et thérapie génique antitumorale

La production d'ARN antisens, *in situ*, pour inhiber spécifiquement l'expression d'oncogènes a été décrite dans plusieurs systèmes cellulaires. L'activation de proto-oncogènes cellulaires représente seulement l'une des étapes dans la transformation des cellules normales en cellules malignes. Il n'est donc pas évident que l'inhibition de l'oncogène puisse inverser le phénotype transformé et inhiber la prolifération tumorale. Une expérience récente démontre que ce pourrait être le cas pour les oncogènes de la famille *ras* dont l'activation par mutations ponctuelles a été détectée dans un grand nombre de tumeurs (20 % à 30 %). Une lignée humaine, provenant d'une tumeur du colon, perd son caractère tumoral chez la souris athymique lorsque

l'allèle *Ki-ras* muté est sélectivement inactivé par recombinaison homologue [75]. L'inactivation de l'allèle normal est sans effet. Des constructions antisens dirigées contre l'oncogène *Ki-ras* réduisent le pouvoir tumorigène de cellules en culture [76], comme cela a été démontré avec des oligonucléotides antisens dirigés contre l'oncogène *Ha-ras* dans une approche pharmacologique décrite plus haut.

D'autres cibles que les oncogènes peuvent être visées dans une approche antisens ayant pour but d'inhiber la prolifération tumorale. Une étude récente montre qu'un ARN antisens, complémentaire de l'ARN messager du facteur de croissance IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), bloque la prolifération cellulaire de glioblastomes du rat [77]. Exprimé sous forme épisomique dans des cellules tumorales, cet ARN antisens empêche le développement de tumeurs chez le rat syngénique. Plus surprenante est l'observation que des cellules de glioblastome exprimant l'antisens, injectées au rat, induisent une régression de tumeurs induites préalablement par l'injection des mêmes cellules non transfectées. Ce résultat semble être dû à une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales de glioblastome induite par l'injection des cellules tumorales exprimant l'antisens. Ces résultats ouvrent la voie à un traitement de glioblastomes par une approche de thérapie cellulaire. Des essais cliniques doivent débiter prochainement à Cleveland.

Conclusion

L'utilisation des oligonucléotides antisens constitue une voie d'approche séduisante pour contrôler sélectivement l'expression d'un gène unique au sein d'une cellule vivante. Cette stratégie fournit des outils de biologie moléculaire et cellulaire qui peuvent être très utiles pour analyser le rôle joué par un gène dans la physiologie cellulaire. Elle est particulièrement attrayante dans le cas des eucaryotes, pour lesquels on ne dispose pas des mêmes outils génétiques que chez les procaryotes. Elle permet, par exemple, de distinguer les effets biologiques des différents

membres d'une famille multigénique [78], ou de contrôler le cycle cellulaire [79]. Même si des protéines sont très voisines dans leur structure primaire, il existe en général suffisamment de différences au niveau de la séquence des gènes pour concevoir des oligonucléotides antisens spécifiques de l'un de ces gènes. Il faut cependant être prudent dans l'analyse des résultats car, la séquence complète du génome humain n'étant pas (encore) disponible, on ne peut exclure qu'un autre gène cellulaire possède la séquence complémentaire de l'oligonucléotide antisens utilisé. Cette ambiguïté peut être levée si deux oligonucléotides antisens dirigés contre deux régions du même ARN messager entraînent des effets biologiques identiques. Il ne faut pas oublier également qu'un oligonucléotide antisens peut se fixer sur d'autres cibles cellulaires que l'ARN messager visé, en particulier des protéines [28, 39].

La stratégie antisens fournit les bases d'une nouvelle approche thérapeutique, fondée sur l'inhibition sélective de l'expression des gènes, plutôt que sur celle des produits de cette expression, c'est-à-dire les protéines. La spécificité est considérable, puisqu'il est possible de faire la discrimination entre deux gènes qui ne diffèrent que par une seule base [52]. Les premiers essais sur des animaux démontrent que cette sélectivité est conservée *in vivo*. Le développement des premiers essais thérapeutiques chez l'homme soulève des questions générales qui ne sont pas différentes de celles rencontrées lors du développement de tout médicament (pharmacocinétique, métabolisme, toxicologie...) (*voir* [80] pour une revue récente). En particulier, les effets secondaires potentiels, dus à la fixation des oligonucléotides antisens sur d'autres cibles que les acides nucléiques, restent à évaluer [28]. De nombreuses sociétés de biotechnologies se sont créées, en particulier aux États-Unis, pour développer les applications thérapeutiques des oligonucléotides [81]. La plupart des grands groupes pharmaceutiques ont également des programmes de recherche et développement dans ce domaine. L'un des volets de la thérapie géni-

que fait également appel à la stratégie antisens [82].

Une recherche active s'est développée autour de la chimie des oligonucléotides et de leurs analogues pour mettre au point de nouvelles générations de molécules actives. L'utilisation de transporteurs et de vecteurs pour les oligonucléotides antisens est en cours d'expérimentation pour améliorer la biodisponibilité et le ciblage tissulaire et/ou cellulaire de ces agents (*voir Tableau II*). L'attrait de la stratégie

antisens tient non seulement à la sélectivité d'action des oligonucléotides mais également à la généralité de ses applications. Tout gène dont la séquence est connue peut être la cible d'un oligonucléotide antisens, si l'on envisage son implication dans un phénomène pathologique. Les études *in vivo* actuellement en cours devraient rapidement fournir les éléments nécessaires à l'évaluation du potentiel thérapeutique de cette nouvelle classe d'agents pharmacologiques ■

Summary

The antisense strategy: new therapeutic approaches

Selective control of gene expression can be achieved with nucleic acids which bind specific sequences of messenger RNAs. The so-called « antisense » strategy makes use of either synthetic oligonucleotides or RNA transcripts produced *in situ* from DNA constructs. Several mechanisms are involved in the inhibition of mRNA translation. The mRNA may be degraded by endogenous enzymes when it binds the antisense molecule. For instance, ribonuclease H (RNase H) cleaves the RNA in RNA-oligodeoxynucleotide hybrids. Oligonucleotides have been chemically modified to protect them against nuclease degradation and to enhance all uptake. Cell culture experiments have provided evidence for the sequence specificity of mRNA translation inhibition. Several animal experiments on tumors or viral infections have shown that antisense oligonucleotides can exert their inhibitory activity *in vitro*. A few clinical trials have been initiated in the fields of cancer and AIDS. Meanwhile basic research is continuing on the chemistry of modified oligonucleotides and on the development of carriers and vectors that could enhance the bioavailability and the pharmacokinetic behavior of antisense oligomers, together with

their cell uptake and compartmentalization properties. Side effects due to oligonucleotide binding to other targets than nucleic acids have to be explored.

DNA constructs expressing antisense RNA could be used in a gene therapy approach. A ribozyme structure can be incorporated in the RNA transcript to induce cleavage of the target messenger or viral RNA. Inhibition of growth factors such as IGF1 by antisense RNA has been shown to induce regression of glioblastoma in animal experiments. Antisense and ribozyme constructs have demonstrated inhibitory activity against HIV infection. Clinical trials will be initiated to evaluate the potential of these approaches in a cell therapy protocol.

Antisense strategies offer new opportunities to control gene expression in a highly selective way. They have provided interesting tools in molecular and cellular biology to analyze the physiological role of specific genes. There are still many questions raised by the development of their therapeutic applications. The next few years should tell us what is the future of antisense approaches in both gene-specific pharmacology and gene therapy.