

## Vers une utilisation thérapeutique des introns de groupe II ?

Les introns dits « de groupe II » [1] sont constitués d'un grand ribozyme et, pour la plupart d'entre eux, d'un cadre de lecture codant pour une protéine pouvant assurer jusqu'à trois fonctions (transcriptase inverse, maturase et ADN endonucléase). Ces introns d'un type bien particulier sont capables de fonctionner aussi bien à l'endroit qu'à l'envers. A l'endroit, leur sort, en tant qu'introns, est, bien sûr, d'être retirés d'un transcrit primaire; c'est le ribozyme qui, par son activité catalytique, assure l'épissage, la protéine spécifiée par le cadre de lecture intronique se bornant à faciliter, par son activité maturase, l'assemblage tridimensionnel des segments de l'intron destinés à former l'ARN catalytique. A l'envers, en revanche, c'est-à-dire en mode d'épissage inverse, les introns de groupe II se comportent comme des rétrotransposons, capables de se réinsérer dans le génome (figure 1A). Cette réinsertion repose sur une étroite collaboration entre le ribozyme et la protéine: dans le cas par exemple de l'intron de *Lactobacillus lactis* [2], les nucléotides - 24 à - 14 et + 5 à + 7 de part et d'autre du site d'insertion sont reconnus exclusivement par la protéine, tandis que le segment central de la cible (- 13 à + 4) forme des paires canoniques avec des séquences complémentaires dans le ribozyme.

Puisque l'intron reconnaît son site d'insertion en partie au moyen d'interactions Watson-Crick, il devrait être possible d'altérer de manière délibérée la nature de sa cible en changeant la séquence des segments de ribozyme qui s'apparient avec celle-ci. Lambowitz *et al.* ont tout d'abord repéré au long de l'ADN proviral de HIV-1 plusieurs sites dont la séquence paraissait compatible avec ce que l'on sait de la spécificité de

reconnaissance de la protéine spécifiée par l'intron de *L. lactis* [2]. Ils ont ensuite « corrigé » la séquence du ribozyme pour la rendre complémentaire des cibles choisies: deux des introns ainsi bricolés s'insèrent efficacement dans les sites auxquels les expérimentateurs les avaient adaptés. Le taux de succès est bien sûr encore plus élevé quand les séquences cibles potentielles sont laissées libres de choisir leurs partenaires: ainsi, à partir d'une population de ribozymes dont les segments de reconnaissance des exons avaient été remplacés par des séquences aléatoires, quatre nouvelles molécules reconnaissant chacune une cible différente dans l'ADN de HIV ont pu être isolées par sélection *in vivo* dans *E. coli*. Dans ce système de sélection, le plasmide donneur contient l'intron et, à l'intérieur de celui-ci, un promoteur qui permet, si l'intron s'insère dans la séquence cible du plasmide receveur, d'exprimer un gène de résistance à un antibiotique situé au voisinage de la séquence cible: les introns « gagnants » révèlent leur présence par l'activation de ce gène de résistance, permettant ainsi à l'expérimentateur de les sélectionner.

Ces expériences montrent que dans un contexte procaryote (*L. lactis*), les introns de groupe II peuvent être utilisés pour inactiver à peu près n'importe quel gène cible. Cette inactivation est soit définitive, si l'intron est inséré en sens inverse de la transcription et ne peut donc plus être excisé, soit facultative, si l'orientation est celle du transcrit et si l'épissage a été rendu conditionnel (par exemple en plaçant la séquence codante de la protéine de l'intron sous le contrôle d'un promoteur inductible). Et chez un eucaryote? Sachant que les quelque 150 introns de groupe II connus à ce jour pro-

viennent tous des génomes mitochondriaux et chloroplastiques, ou encore des ancêtres bactériens de ces organites, on pouvait douter de leur aptitude à fonctionner dans un contexte eucaryote. Pourtant, des expériences préliminaires [2] consistant à transférer des cellules embryonnaires humaines avec des liposomes contenant les uns le complexe entre l'ARN intronique et la protéine, les autres la cible plasmidique de ce même complexe, paraissent montrer qu'il y a bel et bien eu transposition.

En admettant que les introns de groupe II puissent fonctionner dans nos cellules, leur transposition est-elle suffisamment spécifique pour l'usage thérapeutique que suggèrent Lambowitz et ses collègues? Un début de réponse à cette question a été récemment apporté par des chercheurs qui ont suivi le devenir de l'intron de *L. lactis* après son introduction dans une souche bactérienne qui en était dépourvue [3]. Après quelques heures de croissance - une durée suffisante pour que 40 à 60 % des molécules d'un plasmide portant la séquence cible aient effectivement reçu l'intron - une fraction non négligeable des cellules (jusqu'à peut-être 2 %) a également incorporé l'intron dans le chromosome bactérien, où au moins huit sites différents peuvent servir de cible. Contrairement à l'insertion dans la cible normale, beaucoup de ces événements de transposition ectopique ne font pas appel à l'activité ADN endonucléase de la protéine, mais requièrent en revanche une étape de recombinaison homologue. D'où l'hypothèse selon laquelle le mécanisme établi par Lambowitz et ses collègues, dans lequel l'intron envahit directement un ADN double brin (figure 1A), ne peut s'appliquer à la

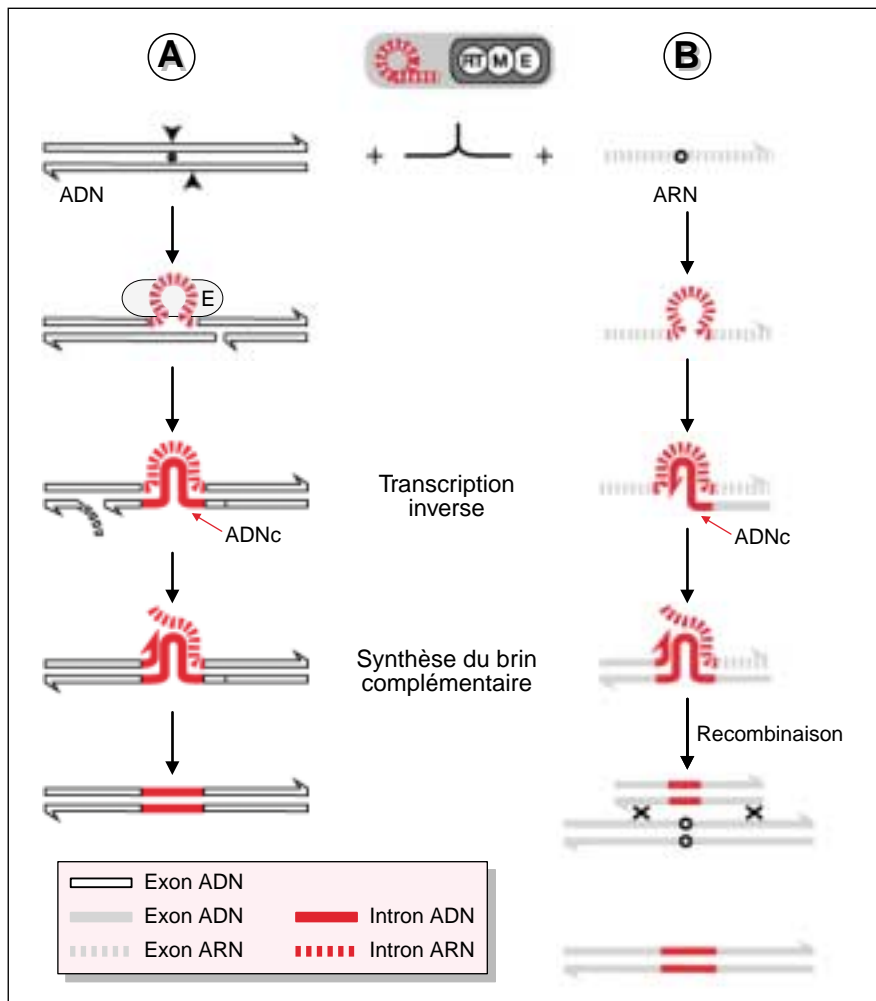


Figure 1. **Mécanismes d'épissage inverse d'un intron de groupe II dans le génome.** L'ARN de l'intron est associé à la protéine codée par l'intron qui possède trois activités, maturase, transcriptase inverse et endonucléase. **A.** Épissage inverse de l'intron au niveau de la jonction exon-exon de l'ADN double brin. Dans un premier temps, l'ARN de l'intron s'insère au niveau du brin sens de l'ADN tandis que le brin antisens est clivé grâce à l'activité endonucléase de la protéine. Le brin antisens sert alors d'amorce pour la transcription inverse de l'ARN et le brin complémentaire est ensuite synthétisé. La dernière étape est la réparation de l'ADN double brin. **B.** Épissage inverse de l'intron au niveau d'un ARN. Après insertion de l'ARN de l'intron au niveau du transcrit, sont synthétisés l'ADN complémentaire puis le deuxième brin d'ADN. Le nouveau fragment d'ADN est ensuite intégré dans le génome par recombinaison. Ce processus ne nécessite pas d'activité endonucléase mais est dépendant de l'activité recombinase de la cellule.

plupart des transpositions ectopiques. Ces dernières résulteraient d'un épissage inverse dans un ARN simple brin, lequel serait suivi d'une transcription inverse et d'une recombinaison avec la copie génomique de cet ARN (figure 1B). On peut bien sûr douter de l'importance de cette voie de transposition dans des cellules qui sont dépourvues d'une recombinaison homologue efficace. Restent malheureusement les quelque 20 % d'événements de transposition ectopique qui, parce qu'ils surviennent en dépit de l'inactivation de la recombinase *RecA*, doivent correspondre à l'attaque d'une cible double brin. Combien de sites dans le chromosome de *L. lactis* sont susceptibles d'être ainsi envahis « par erreur », et à quelle fréquence ? Est-il possible de diminuer le taux de transposition ectopique en couplant sélection positive pour l'aptitude à envahir la cible choisie et contre-sélection des molécules enclines à l'erreur ? Ce n'est qu'après avoir répondu à ces questions que le potentiel thérapeutique des introns de groupe II pourra être véritablement estimé.

1. Michel F, Ferat JL. Structure and activities of group II introns. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 435-61.
2. Guo H, Karberg M, Long M, Jones JP. III, Sullenger B, Lambowitz AM. Group II introns designed to insert into therapeutically relevant DNA target sites in human cells. *Science* 2000; 289: 452-7.
3. Cousineau B, Lawrence S, Smith D, Belfort M. Retrotransposition of a bacterial group II intron. *Nature* 2000; 404: 1018-21.

#### François Michel

UPR 2167 Centre de génétique moléculaire, Bâtiment 26, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.