

Modifications génétiques par un oligonucléotide triple hélice

Les stratégies capables de modifier sélectivement un gène choisi représentent potentiellement de puissants outils, en recherche fondamentale comme en thérapeutique [1]. A cet égard, les oligonucléotides triple hélice sont porteurs, depuis plusieurs années, de l'espoir de nombreuses équipes. Ces oligonucléotides de synthèse, en effet, sont choisis pour reconnaître, avec une très bonne spécificité, des séquences d'ADN double brin et forment localement avec la séquence cible une « triple hélice » (figure 1A). Ils peuvent agir comme des inhibiteurs compétitifs pour des protéines se liant à l'ADN [2] et inhiber l'activité d'un promoteur mesurée dans un système artificiel de transfection dans les cellules. Une de leur propriétés les plus intéressantes est leur capacité, s'ils sont convenablement modifiés, à introduire une lésion dans l'ADN cible. Par exemple, des oligonucléotides couplés à une molécule de psoralène introduisent un pontage interbrin dans la séquence cible quand ils sont irradiés en lumière UV, à 365 nm [3]. Ce pontage est très mal réparé dans les cellules, puisque environ 80 % des lésions ne le sont pas et les 20 % restant sont réparés avec un très fort taux d'erreurs, aboutissant à l'introduction de mutations dont le nombre et la qualité sont spécifiques de la lésion introduite [4, 5].

L'effet des oligonucléotides triple hélice dans des systèmes artificiels de transfection transitoire est maintenant bien établi [6]. En revanche, la question essentielle de leur action sur un gène endogène cellulaire reste ouverte. Dans deux études indépendantes [7, 8], la capacité des oligonucléotides liés au psoralène d'introduire des mutations dans une séquence cible a été utilisée pour

mettre en évidence une interaction entre un oligonucléotide triple hélice et une cible dans le génome de cellules de mammifères. Cependant, la nature des mutations obtenues diffère d'une étude à l'autre. De plus, les mutations ne sont pas caractéristiques des mutations induites par les pontages interbrins du psoralène [5]. Enfin et surtout, la spécificité d'action de l'oligonucléotide a été principalement déduite de l'absence d'effet d'un oligonucléotide de séquence différente. Ce contrôle est loin d'être idéal, car les oligonucléotides peuvent avoir des effets biologiques qui dépendent de leur séquence mais qui ne sont pas liés à leur association avec un acide nucléique [9] : ils peuvent par exemple interagir avec des protéines cellulaires.

Nous avons mis à profit les avantages de la levure, dont on peut modifier le génome très facilement et que l'on peut sélectionner très rapidement, pour mettre au point un système test adaptable à toute séquence cible d'oligonucléotide.

La séquence que nous avons testée est le « polypurine tract » (PPT) du virus de l'immunodéficience humaine de type I (VIH-1) – il s'agit d'une séquence homopurine/homopyrimidine de 16 paires de bases juxtante, à son extrémité 5', une région pentathymidique. Nous avons construit des souches de levures congéniques où le gène *URA3*, un gène auxotrophe utilisé ici comme marqueur, a été inactivé par l'insertion, dans sa région codante, de la séquence PPT positionnée de façon à y introduire un codon « stop ». Ces cellules génétiquement modifiées ont ensuite été traitées par des oligonucléotides couplés au psoralène, puis soumises à une irradiation UVA, afin de provoquer des pontages inter-

brins covalents au niveau de ce codon « stop » (figure 1B). La réparation de ces lésions induit des mutations dont certaines restaurent la fonction du gène *URA3*, ce qui permet aux levures de se multiplier en l'absence d'uracile. Le nombre de mutants obtenus est quantifié à l'aide de milieux de culture appropriés qui permettent de sélectionner les révertants (figure 1C). Les mutations sont ensuite caractérisées par le séquençage de la région d'intérêt.

A l'aide de ce modèle expérimental, nous avons pu démontrer, pour la première fois sur un gène eucaryote endogène et avec les témoins adéquats (c'est-à-dire des témoins de spécificité au niveau de la cible), un effet « triple hélice » dans des cellules vivantes [10]. En effet, nos résultats montrent qu'un oligonucléotide de type phosphoramidate [11] couplé au psoralène, est capable d'induire un nombre significatif de mutations au niveau de sa cible. Ce même oligonucléotide n'agit pas sur une lignée congénique porteuse d'une séquence témoin interdisant la formation d'une triple hélice (figure 1C). Par ailleurs, les mutations observées sont semblables à celles qui sont obtenues lorsque l'ADN ciblé est traité *in vitro* par l'oligonucléotide puis introduit dans les cellules.

Ces résultats apportent la démonstration, sans ambiguïté, d'un effet triple hélice dans une cellule, et sont donc encourageants. Cependant il faut souligner qu'un certain nombre d'obstacles restent à surmonter avant que la stratégie triple hélice puisse être appliquée à des fins thérapeutiques. En dehors de la question de « vectorisation », ou comment délivrer au noyau cellulaire une quantité optimale d'oligonucléotide pour induire les effets voulus, il nous semble que le

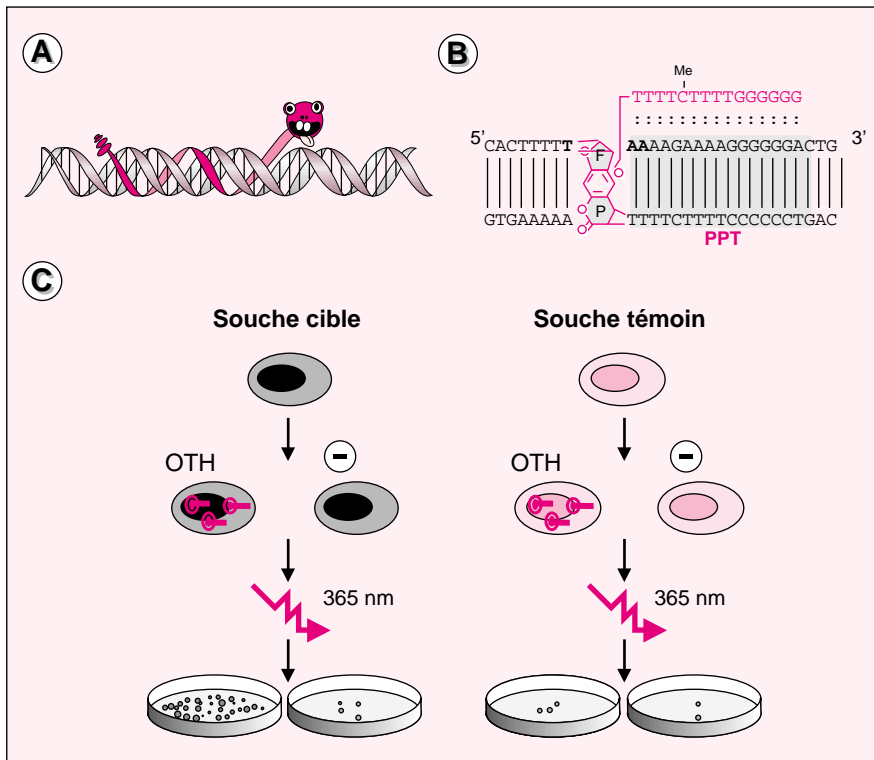


Figure 1. Utilisation des oligonucléotides triple hélice pour induire des modifications génétiques. **A.** Certains oligonucléotides de synthèse sont capables de reconnaître spécifiquement une séquence d'ADN double brin, s'enroulant dans le grand sillon pour former une « triple hélice ». Ces oligonucléotides peuvent être rendus fonctionnels par des ligands qui permettent d'introduire une lésion dans l'ADN. **B.** La séquence polypurine tract (PPT) du virus VIH1 est insérée dans la région codante du gène URA3 de la levure de façon à y introduire un codon stop (TAA, en noir). L'oligonucléotide utilisé (en rouge) est couplé à une molécule de psoralène qui s'intercale entre les bases de ce codon « stop » et, après irradiation par des UVA, induit des pontages inter-brins covalents. **C.** La méthode développée pour démontrer sans ambiguïté l'effet d'un oligonucléotide triple hélice (OTH) repose sur la comparaison de deux souches congéniques de levure : dans les deux souches, le gène URA3 (qui permet aux levures de se multiplier en absence d'uracile) est inactivé par l'insertion soit de la séquence PPT (souche cible), soit d'une séquence témoin incapable de former une triple hélice (souche témoin). Après transfection d'un oligonucléotide couplé au psoralène, les cellules sont irradiées à 365 nm pour provoquer la formation de lésions sur la cible. Elles sont ensuite ensemencées sur un milieu de sélection sans uracile. En l'absence d'OTH, les colonies formées correspondent à une réversion spontanée (taux basal de mutations). Dans la souche cible, l'OTH augmente le nombre de colonies. Cet effet peut être attribué à la formation de triple hélices in situ sur le gène endogène, car ce même OTH ne produit aucun effet décelable dans la souche témoin.

développement de nouvelles classes de molécules modifiées, mieux adaptées à la formation de triple hélices stables dans le milieu physiologique intracellulaire (et bien sûr non toxiques), représente un des enjeux majeurs pour l'avenir de cette tech-

nologie. En effet, d'après nos estimations, la séquence cible n'est touchée que dans un cas sur mille. Notre modèle expérimental sera utile pour le criblage comparatif de nouvelles molécules, et devrait faciliter leur optimisation.

1. Hélène C. The antigene strategy: progress and perspectives in selective gene silencing. In: Malvy C, Harel-Bellan A, Pritchard LL. eds. Boston : Kluwer Academic Publ, 1999 : 3-16. *Triple helix forming oligonucleotides*.
2. Grigoriev M, Praseuth D, Robin P, et al. A triple helix-forming oligonucleotide-intercalator conjugate acts as a transcriptional repressor via inhibition of NF kappa B binding to interleukin-2 receptor alpha-regulatory sequence. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 3389-95.
3. Takasugi M, Guendouz A, Chassignol M, et al. Sequence-specific photo-induced cross-linking of the two strands of double-helical DNA by a psoralen covalently linked to a triple helix-forming oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 5602-6.
4. Barre FX, Asseline U, Harel-Bellan A. Asymmetric recognition of psoralen interstrand crosslinks by the nucleotide excision repair and the error-prone repair pathways. *J Mol Biol* 1999 ; 286 : 1379-87.
5. Barre FX, Giovannangeli C, Hélène C, Harel-Bellan A. Covalent crosslinks introduced via a triple helix-forming oligonucleotide coupled to psoralen are inefficiently repaired. *Nucleic Acids Res* 1999 ; 27 : 743-9.
6. Giovannangeli C, Hélène C. Progress in developments of triplex-based strategies. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997 ; 7 : 413-21.
7. Majumdar A, Khorlin A, Dyatkina N, et al. Targeted gene knockout mediated by triple helix forming oligonucleotides. *Nat Genet* 1998 ; 20 : 212-4.
8. Vasquez KM, Wang G, Havre PA, Glazer PM. Chromosomal mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1999 ; 27 : 1176-81.
9. Feigon J, Dieckmann T, Smith FW. Aptamer structures from A to zeta. *Chem Biol* 1996 ; 3 : 611-7.
10. Barre FX, Ait-Si-Ali S, Giovannangeli C, et al. Unambiguous demonstration of triple-helix-directed gene modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 3084-8.
11. Chen JK, Schultz RG, Lloyd DH, Gryaznov SM. Synthesis of oligodeoxyribonucleotide N3'→P5' phosphoramidates. *Nucleic Acids Res* 1995 ; 23 : 2661-8.

François-Xavier Barre
Linda L. Pritchard
Annick Harel-Bellan

Cnrs UPR 9079, Institut Fédératif André Lwoff, 7 rue Guy Moquet, 94801 Villejuif Cedex, France.