

AMBASSADE DE FRANCE AUX ETATS-UNIS

MISSION POUR LA SCIENCE ET LA TECHNOLOGIE

CONSULAT GENERAL DE SAN-FRANCISCO

LE 'RNA', AGENT THERAPEUTIQUE ET NOUVEL OUTIL EN RECHERCHE PHARMACEUTIQUE, UN APERCU AUX USA.

Septembre 2003

Armand RENUCCI

Attaché pour la Science et la Technologie^{1,2}

¹ Consulat Général de France. 530 Bush Street. San Francisco, CA, 94108. USA. Tél: 415.397.4440. Fax: 415.397.9947.

² attache.sdv@consulfrance-sanfrancisco.org

Sommaire

Résumé	p2
- I. Introduction et définitions.	p3
- II. Antisens et ribozymes : une application qui s'est révélée difficile au niveau thérapeutique.	p5
- III. Le 'RNA interference', une approche d'avenir ?	
III-1. Les développements technologique de l'outil RNAi.	p7
III-1-1 Efficacité :	
III-1-2 Stabilité :	
III-1-3 Accessibilité : - au niveau cellulaire.	
- in vivo : injection systémique.	
- utilisation de vecteurs.	
III-2. Caractérisation et validation de nouvelles cibles pharmacologiques.	p9
III-2-1. Caractérisation de gènes cibles à valeur pharmacologique et /ou thérapeutique.	
III-2-1-1. Utilisation de culture de cellules.	p10
III-2-2-2. Utilisation de modèles animaux.	p12
III-2-2. Le RNAi appliqué à la validation de cibles pharmacologiques.	p13
III-3. Le siRNA comme agent thérapeutique.	p14
III-3-1. Cancer.	
III-3-2. Maladies virales	p16
- IV. Conclusions.	p18
Annexe :	
- Liste de sociétés engagées dans des technologie liées au RNA.	p19
- Figure 1 : Mécanismes du 'RNA interference'.	p20
- Figure 2 : Les cibles thérapeutiques antiHIV.	p21

RESUME

La biologie moléculaire rentrée dans l'ère génomique permet aujourd'hui de caractériser des gènes impliqués dans des processus physiopathologiques et d'analyser leur fonction in vivo. Les retombées dans le domaine santé sont en pleine évolution, il est en effet possible de définir des **cibles thérapeutiques au niveau du gène (DNA)** grâce à l'inactivation fonctionnelle obtenue in vivo dans un mutant. Depuis la fin des années 80 cet objectif est devenu possible au niveau du **RNA** la molécule qui assure la traduction de l'information génétique en protéine.

La mise en œuvre des premiers outils développés, bien que spécifique et directe dans le principe s'est révélée difficile et aléatoire d'un point de vue efficacité. Cette voie a été récemment relancée par la caractérisation du '**RNA interférence**', (**RNAi**). Ce mécanisme cellulaire, responsable de la dégradation de molécules de type RNA, peut être induit, à l'aide petites molécules synthétiques, les **siRNA**, et permet l'inactivation fonctionnelle spécifique d'un gène cible avec deux applications majeures :

- **En recherche pharmaceutique** : Les premiers résultats présentés par les sociétés qui ont investi sur une plate-forme de type RNAi, une cinquantaine aux USA, sont très prometteurs dans la perspective de la mise au point de nouveaux médicaments avec des délais raccourcis. Le '**RNAi**', combiné avec les outils de la génomique et appliqué à haut débit sur des modèles cellulaires en culture et in vivo sur des modèles animaux, permet en une seule étape la caractérisation et la validation de collections originales de gènes comme cibles pharmacologiques. Un gain de temps considérable est ainsi obtenu par rapport aux stratégies traditionnelles

- **Comme outil thérapeutique direct** : le RNAi permet potentiellement d'aborder un large spectre de pathologies devenues des problèmes de société : cancer, maladies métaboliques (diabète, obésité), maladies virales (HIV) etc... et pour lesquelles des approches pharmacologiques conventionnelles n'existent pas ou ne sont pas utilisables. Sa généralisation pratique et son utilisation en routine appliquée aux grandes pathologies évoquées requièrent encore de nombreux développements technologiques en particulier liés à l'administration et la distribution efficace du siRNA. Les résultats des essais cliniques en préparation ou en cours décideront de l'avenir du médicament RNA basé sur le '**RNA interférence**'.

Le ‘RNA’, agent thérapeutique et nouvel outil en recherche pharmaceutique, un aperçu aux USA.

I. Introduction et définitions.

Les outils de la biologie moléculaire entré dans l’ère génomique ont permis de disséquer aux niveaux cellulaires et moléculaires un grand nombre de mécanismes biologiques et de processus physiopathologiques. Les applications dans le domaine santé sont en pleine expansion, en effet un nombre croissant de gènes impliqués de manière directe ou indirecte dans ces processus correspondent à des cibles thérapeutiques potentielles. Afin de valider un gène, c’est à dire évaluer son implication effective dans le processus physiopathologique étudié, une stratégie majeure correspond à l’inactivation fonctionnelle de ce gène. Elle peut être obtenue in vivo avec une mutation affectant le gène (au niveau DNA) chez un modèle animal.

La fin des années 80 a marqué l’apparition de protocoles permettant d’atteindre cet objectif au niveau RNA. Le RNA, dit messenger, est une molécule transcrite à partir du gène (DNA) dont elle porte l’information ; la traduction d’un RNA conduit à la synthèse d’une protéine spécifique effectrice de une ou plusieurs fonctions cellulaires. L’induction de la dégradation du RNA du gène ciblé conduit à la disparition de sa protéine.

Deux stratégies basées sur la reconnaissance d’une courte séquence du RNA spécifique du gène analysé ont été initialement explorées. Dans l’approche ‘**antisens**’ (**AS**) un fragment de DNA synthétique complémentaire de cette séquence, induit après hybridation soit le blocage de la traduction du RNA soit entraîne sa dégradation par un mécanisme impliquant la RNaseH (une des enzymes capables de dégrader le RNA). Dans l’approche ‘**ribozyme**’, l’hybridation de petits RNA complémentaires de certaines séquences du RNA cible conduit à son clivage par le même mécanisme que celui utilisé dans l’épissage du préRNA, la transcription d’un gène conduit à la formation d’un préRNA qui subit une maturation en RNA traduisible en protéine (les séquences codantes du préRNA, exons, sont assemblées après élimination des fragments non codants, les introns).

Récemment un mécanisme naturel responsable de la dégradation du RNA a été caractérisé, le **'RNA interférence' (RNAi)**. Ce processus contrairement à celui mis en jeu dans le contexte AS a une valeur physiologique. Il correspond à un mécanisme de défense naturel de la cellule face à une infection virale ou à des mouvements de transposons (rétrovirus endogènes capables de s'intégrer dans le génome et de se comporter comme agents mutagènes). Initialement mis en évidence chez les plantes ce mécanisme s'est avéré général chez les métazoaires incluant les mammifères et a été caractérisé en détail chez le ver nématode *Coenorhabditis Elegans* :

- La dégradation d'un RNA spécifique est basée, non pas sur un DNA mais sur un RNA complémentaire présent sous la forme d'une petite molécule double brin (dsRNA) dans la cellule appelé **'silencing RNA', siRNA** (Figure 1 p20).
- Un siRNA est reconnu par le complexe (RISC) qui grâce à une activité hélicase permet l'hybridation du siRNA, au RNA cible (brin complémentaire). Cet hybride induit une activité RNase qui conduit à la dégradation du RNA.
- Après dégradation, le complexe RISC associé au siRNA est recyclé permettant l'amplification de l'activité d'une molécule de siRNA individuelle.

Dans la pratique l'expérimentateur fournit soit des **siRNA synthétiques** exogènes soit un **vecteur** qui permet **l'expression du siRNA** dans la cellule, p8). Si une molécule dsRNA de plus de 30 nucléotides (correspondant soit à une infection par un virus, soit éventuellement fourni par l'expérimentateur) pénètre dans la cellule elle est reconnue par un complexe protéique (DICER) qui la fragmente en RNA suffisamment petits pour se comporter comme des siRNA capables induire la dégradation d'un RNA complémentaire (Figure 1, p20).

L'objectif est ici de faire un point non exhaustif, mais suffisamment représentatif, des applications thérapeutiques directes ou pharmacologiques de l'outil RNA qui sont en cours de développement aux USA dans les laboratoires industriels mais aussi académiques avec quelques exemples européens. Une partie importante des données présentées sont issues d'une conférence organisée à San Diego (USA) par le Cambridge Health Institute (CHI) en juin 2003.

Les données synthétisées ici montrent clairement que l'approche RNAi s'avère la plus efficace et la plus prometteuse dans la **caractérisation et la validation de nouvelles cibles à valeur**

pharmacologique et comme **outil thérapeutique** direct. Il apparaît néanmoins que l'approche AS n'est pas totalement abandonnée et fait l'objet de la prochaine section.

II. Antisens et ribozymes : une application qui s'est révélée difficile au niveau thérapeutique.

Ces stratégies ont été explorées par un nombre important de sociétés biotech.. Les limitations techniques apparues au cours de leur exploration n'ont pu être suffisamment maîtrisées pour donner un spectre large d'applications à ces outils (ces limitations seront évoquées de manière comparative dans la section III où sont explicités les mécanismes du RNAi). La société Ribozyme Pharmaceutical (Colorado, USA) qui a investi près de 200 millions \$ sur 10 ans a abandonnée la stratégie ribozymes et développe maintenant une plate-forme RNAi sous la nouvelle appellation Sirna.

Seules deux sociétés californiennes, Isis Pharmaceuticals, (Californie , USA) et Genta Inc. (Berkeley , Californie) conserve une plate-forme AS. Isis associée à Eli Lilly (Indianapolis, USA) ont commercialisé *vitravene*, le seul médicament RNA validé par la FDA ('Food and Drug Administration' aux USA), il est utilisé dans le traitement des rétinites associées au SIDA. Une collaboration avec Elan Pharmaceuticals (Irlande) a été mise en place pour optimiser l'administration par voie orale. D'autre part Isis effectue actuellement les essais cliniques (phase III) de l'*affinitak* (combiné avec d'autres composants), l'oligonucléotide antisens correspondant est dirigé contre l'oncogène Ha-ras impliqué dans un cancer pancréatique. Enfin Genta Inc. développe le *genasens* en collaboration avec Aventis Pharma, et met en place également une plate-forme RNAi.

III Le 'RNA interférence', une approche d'avenir ?

Ces deux dernières années ont été marquées par la validation de l'outil RNAi réalisée par un nombre important de laboratoires académiques et industriels. Des gènes cellulaires et viraux impliqués dans des processus biologiques et physiopathologiques très variés ont été inactivés avec succès au niveau RNA tant in vitro (cultures de cellules) que in vivo (modèles animaux). Les propriétés remarquables de ce mécanisme sont résumées ici :

- Un point essentiel est bien sur la spécificité d'activité (in vivo et in vitro) d'un siRNA : il peut induire jusqu'à 95% de réduction du niveau du RNA correspondant sans interagir avec d'autres RNA même ceux avec une séquence très proches (en AS la spécificité apparaît plus aléatoire en fonction du contexte cellulaire en particulier)
- Toute la séquence d'un RNA est dérivable en siRNA. Même si dans la pratique tous les siRNA couvrant un RNA n'ont pas la même efficacité, cela permet pour chaque gène d'avoir la possibilité d'en caractériser facilement un efficace (en AS peu de séquences apparaissent efficaces et sont plutôt localisées dans la partie 5' du RNA).
- L'inhibition bien que transitoire peut être effective sur une durée très longue, jusqu' à 5 semaines après une application de siRNA (en AS les durées sont plus courtes), ce paramètre est bien entendu très important dans un contexte thérapeutique.
- L'efficacité de l'inhibition est liée aux processus de recyclage du siRNA mais également à la plus grande stabilité des RNA double brin (par opposition en AS, l'oligonucléotide DNA qui est simple brin est très instable et doit être modifié chimiquement).
- Un corrélat de la stabilité est une activité effective observée pour de faibles concentrations de siRNA limitant ainsi les risques de toxicité dans un contexte thérapeutique (en AS les doses nécessaires sont plus importantes et les modifications augmentent les risques de toxicité).
- Le RNAi présente d'un point de vue application thérapeutique des avantages importants : il permet d'une part d'inhiber un unique allèle d'un gène (l'exemple de K-ras est présenté p15) permettant ainsi d'utiliser une cible pour laquelle une approche pharmacologique conventionnelle n'est pas possible, d'autre part deux gènes (même théoriquement plus) peuvent être inactivés simultanément créant un effet synergique (un exemple avec le virus HIV est présenté, p16/17). Enfin cette approche permet de toucher des gènes impliqués à tous les niveaux d'un processus physiopathologique, même ceux pour lesquels comme les facteurs de transcription nucléaire, une approche pharmacologique est difficile. Cet élargissement du choix des cibles permet d'optimiser un traitement potentiel pour une plus grande efficacité et une meilleure spécificité en éliminant les gènes possédant de multiples fonctions.
- Les siRNA peuvent être administrés de manière directe mais également grâce à des vecteurs capables de soutenir la synthèse d'un siRNA dans la cellule cible avec un certain nombre d'avantages spécifiques (III-1 utilisation de vecteurs, III-2-1-1 et III-2-1 maladies virales)

- Enfin la synthèse d'un siRNA peut être réalisée in vitro de manière peu coûteuse par voie enzymatique à partir d'une matrice DNA (la synthèse chimique et les modifications d'un oligonucléotide DNA dans une approche AS sont beaucoup plus onéreuses).

L'utilisation de l'approche RNAi qui repose sur un mécanisme physiologique cellulaire basé sur le RNA apparaît supérieure à l'approche AS basée sur l'utilisation de DNA et une simple interférence avec d'autres processus cellulaires. Les stratégies développées par les différents laboratoires sont présentées suivant 3 thèmes que certaines sociétés abordent de manière continue :

- Les développements technologique de l'outil RNAi.
- Caractérisation et validation de cibles pharmacologiques.
- Le RNA(i) comme agent thérapeutique.

III-1. Les développements technologique de l'outil RNAi.

Un certains nombre de sociétés ont concentré leurs efforts sur une optimisation des différents paramètres qui conditionnent l'efficacité de l'approche. Les questions qui se posent d'une manière plus ou moins séquentielle correspondent en particulier à la recherche d'un compromis entre efficacité, toxicité et coûts des siRNA.

-III-1-1. Efficacité du siRNA :

La société Dharmacon, (W.S. Marshall) a réalisé l'inhibition d'un jeu de plusieurs dizaines de gènes avec des collections de siRNA couvrant la totalité des séquences RNA analysées. La comparaison de l'efficacité de ces siRNA a permis sur une base empirique de définir des règles permettant d'anticiper les propriétés d'un siRNA en fonction de sa séquence (par exemple richesse en GC). Pour n'importe quelle séquence ils proposent une combinaison de 4 siRNA ('smartpool') assurant une dégradation effective supérieure à 90% de ce RNA.

-III-1-2 Stabilité du siRNA :

Même si la structure double brin des siRNA leur confère une grande stabilité, il peut être important de l'augmenter en particulier dans un milieu de culture en présence de sérum ou le système circulatoire. Les sociétés Sequitur (D. Samarski) et Aventis Pharmaceuticals (K.

Heermeir) ont présentées des modifications en ce sens, respectivement : ‘stealth RNA’ (modification confidentielle) et phosphorothioates ou méthylation. (modifications 2’).

-III-1-3 Accessibilité du siRNA :

- Au niveau cellulaire :

Afin de faciliter le passage de la membrane cellulaire chargée, la société Mirus (J.Hagstrom), travaille sur la modification de la charge des siRNA (modification de la charge négative vers la neutralité ou une charge légèrement positive).

- In vivo :

Cette question conditionne les application thérapeutiques de l’outil ‘RNAi’.

- Injection systémique :

Les sociétés Mirus (J.Hagstrom) et Ribopharma (Von Locker) utilisent la voie systémique en injectant chez la souris sous pression un siRNA (nu) en solution. Ils obtiennent ainsi une distribution significative des siRNA et une dégradation du RNA ciblé dans la plupart des organes. Mirus s’est focalisé sur le tissu hépatique, jusqu’à 60% des cellules hépatiques présentent une absorption de siRNA, et cela dans des condition suffisantes pour inhiber spécifiquement un transgène GFP (la souris transgénique est porteuse du gène GFP, exprimé dans le foie, codant pour une protéine fluorescente permettant une visualisation directe au niveau du tissu). Préalablement à une approche sur l’homme, des stratégies basées sur l’utilisation de cathéters sur des animaux plus gros (porcins) sont développées afin de privilégier la distribution des siRNA dans certains organes,.

- Utilisation de vecteurs :

Les vecteurs utilisés assurent la synthèse d’un siRNA spécifique, grâce à un promoteur (une séquence capable de fixer une RNAPolymerase, enzyme responsable de la synthèse) associé à une séquence qui correspond aux deux brins complémentaires du siRNA séparée par une jonction artificielle. Après transcription les deux parties complémentaires du RNA produit* s’associent à l’exception de la jonction qui forme une boucle (*shRNA : ‘short hairpin loop’ RNA). La boucle obtenue est éliminée par le DICER générant un siRNA fonctionnel. L’utilisation de vecteurs peut permettre de cibler plus spécifiquement et plus efficacement les tissus visés, augmenter la concentration de siRNA grâce à une synthèse intracellulaire et permettre éventuellement une expression stable.

Deux types de vecteurs sont utilisés, des vecteurs qui restent à l'état épisomal dans la cellule, c'est à dire indépendant de son génome (plasmide et adénovirus) et des vecteurs capables de s'intégrer de manière stable dans le génome de la cellule hôte (rétrovirus).

Plasmide :

La société Nucleonics, (C.Satischandran) utilise un plasmide comme vecteur (DNA circulaire). Afin d'augmenter l'absorption intracellulaire le DNA est complexé à la Bupivacaine soit au trilactosylspermine qui permet une absorption préférentielle au niveau des cellules hépatiques (voir III-3-2 , thérapie antiHBV). Des test effectués sur le modèle lapin ont montré la neutralité de ce vecteur : absence d'effets toxiques, d'insertions dans le génome et de déclenchement de réactions immunitaires.

Virus :

La société Galapagos (HE Van Es) utilise un vecteur viral de type adénovirus. Ce vecteur permet en particulier une infection directe (sans adjuvant) et efficace de n'importe quel type cellulaire même à l'état quiescent (les cellules ne se divisent pas). De plus le virus est très stable à l'état épisomal (non intégré au chromosome) dans la cellule.

Des utilisations d'un vecteur rétroviral sont présentées par la société Benitec et divers laboratoires académiques. Ces vecteurs peuvent être modifiés (au niveau des protéines de l'enveloppe) pour cibler spécifiquement certains types cellulaires et s'intègrent dans le génome assurant une expression stable du siRNA.

III-2 Caractérisation et validation de nouvelles cibles pharmacologiques.

Les sociétés biotech. et pharmaceutiques font face à un certain nombre d'enjeux :

- Diversifier leur gamme de médicaments en particulier vers de nouvelles pathologies.
- Obtenir des médicaments les plus efficaces possibles.
- Réduire les temps et les coûts de mise au point traditionnellement importants.

De manière essentielle la mise en place de plate-forme RNAi permet d'obtenir des informations fonctionnelles avec une rapidité inégalée par rapport aux approches traditionnelles. La combinaison avec les outils de la génomique, l'automatisation des protocoles et l'utilisation de modèles cellulaires et animaux permet de répondre en partie à ces préoccupations :

- En permettant de prospecter des collections de gènes liées à un très large spectre de pathologies et de caractériser des cibles originales à valeur pharmacologique et/ou thérapeutique directe.

- D'une manière générale en permettant la validation rapide des gènes cibles potentiels.

III-2-1 Caractérisation de gènes cibles à valeur pharmacologique et /ou thérapeutique.

Les modèles cellulaires en culture représentent des outils importants dans la recherche de cibles pharmacologiques. L'utilisation plus récente de nouveaux modèles animaux a apporté une dimension supplémentaire. De manière essentielle les modèles utilisés présentent de nombreux mécanismes physiopathologiques conservés au cours de l'évolution : la souris, centrale bien sûr par son caractère de mammifère, le poisson ('zebrafish') plus récemment et surtout les modèles invertébrés, le ver *C.Elegans* et la mouche *Drosophile*. qui présentent une organisation beaucoup plus simple et un génome réduit par rapport au génome humain.

La disponibilité des séquences complètes des génomes des différents modèles, des RNA exprimés et des technologies de type puces à DNA ont permis : d'une part d'identifier des collections de gènes potentiellement impliqués dans de nombreuses pathologies, d'autre part d'évaluer leur fonction et/ou leur implication *in vivo* dans des mécanismes physiopathologiques ; il est en effet possible d'analyser des mutants où le gène étudié est inactivé permettant ainsi la validation de ce gène comme cible.

La définition de cibles thérapeutique au niveau du gène, à l'aide de ces outils, est aujourd'hui devenue une étape clé dans la mise au point de nouveaux médicaments.

Néanmoins, malgré une automatisation d'une partie des manipulations, la caractérisation de ces gènes ainsi que l'obtention des mutants correspondants par les voies conventionnelles restent encore lourdes et longue, spécialement chez la souris, et ne permettent d'analyser qu'un nombre limité de gènes.

L'outil RNAi offre une nouvelle stratégie avec une approche fonctionnelle directe à haut débit réalisable non seulement avec un modèle cellulaire mais également à l'échelle d'un organisme modèle. Il devient ainsi possible de réaliser en une seule étape l'identification et la validation (au moins partielle) d'un gène comme cible.

III-2-1-1 Utilisation de culture de cellules.

- La société AGY (San Francisco, USA) développe un programme lié à la caractérisation de gènes dont l'inhibition protège les cellules nerveuses contre un stress physiologique, en

particulier lors de déficits en oxygène et glucose qui interviennent dans une pathologie vasculaire ou cardiaque (attaque, épilepsie....) .

Ils ont optimisé la transfection traditionnellement difficile de cultures primaires de neurones et des lignées établies utilisés comme modèle atteignant 60% d'efficacité. Le crible est basé sur la transfection de collections de siRNA représentatifs de gènes neuraux sur des cultures carencées en oxygène et glucose. Cette stratégie a été validée par la caractérisation de la PARP (poly(ADPribose) polymerase) dont la modulation négative réduit le taux de mort neuronale, 26 nouveaux gènes réduisant le taux de mortalité cellulaire ont été ainsi isolés.

- La société Galapagos, (H .E. Van Es) a développé en collaboration avec Pharmacia une plate-forme automatisée ‘ RNAi/adénovirus’. L’objectif est de caractériser des gènes dont l’inhibition de l’activité est capable d’induire la réversion directe d’un phénotype pathologique. Le vecteur utilisé est un adénovirus recombinant qui assure l’expression d’un siRNA, il ne se réplique pas et présente une grande stabilité Une librairie ordonnée adénovirale exprimant les siRNA correspondant à plus de 4000 gènes à valeur pharmacologique a été construite. Le crible est effectué sur des modèles cellulaires en culture représentatifs des pathologies analysées.

Le vecteur adénoviral a été validé sur plusieurs systèmes :

- Activité des cellules immunitaires : les symptômes allergiques sont liés à la dégranulation de vésicules d’histamine sous l’effet de l’allergène et de l’action des IgE. La dégranulation peut être inhibée par réduction du niveau de la protéine kinase Syk.
- L’adipogenèse se manifeste par une accumulation d’acides gras dans un préadipocyte, le facteur PPARgamma (Peroxisome Proliferation Activated Receptor) dont l’inhibition bloque ce processus apparaît comme une cible majeure dans la pathologie de l’obésité.

Des criblages fonctionnels sont en cours sur plusieurs pathologies : psoriasis (utilisation des cultures primaires de kératinocytes), ostéoporose, asthme allergique, maladie neurodégénérative d’Alzheimer.

- La société Bristol Squibb Meyer (BA Rupnow), a développé une plate-forme RNAi basée sur l’utilisation de lignées S2 issues de la Drosophile. L’utilisation de ce modèle animal est justifié par une des plus large collections de mutants disponibles. L’objectif est de caractériser des gènes qui induisent de manière spécifique la mort cellulaire (apoptose) des cellules transformées dites ‘cancéreuses’. Plusieurs dizaines de gènes ont été identifiés ainsi des orthologues humains (p13).

III-2-2-2 Utilisation de modèles animaux.

La société Devgen (J.Bogaert, Belgique) a développé une plate-forme avec le ver nématode *C.Elegans*. Ce modèle présente un intérêt majeur dans ce type d'approche en effet cet animal simple avec un nombre fixe et limité de cellules présente des phénotypes facilement analysables. Il reproduit au moins partiellement de nombreuses physiopathologies humaines maladies neurologiques, métaboliques (diabète, obésité), musculaire et cardiovasculaire sur la base de mécanismes moléculaires conservés au cours de l'évolution.

Il présente une combinaison d'avantages expérimentaux, par sa petite taille il se prête bien à une analyse automatisée à haut débit limitant les coûts expérimentaux, il se reproduit rapidement, son génome limité à 19000 gènes est bien sûr séquencé et les collections de mutants déjà disponibles permettent de conforter la validation des gènes cibles sélectionnés.

L'objectif est d'identifier des gènes dont l'inhibition induit la disparition d'un phénotype à valeur physiopathologique (par exemple chez un mutant). Le transfert des siRNA est facile et efficace, en effet les vers se nourrissent de bactéries, ainsi des collections de bactéries contenant un plasmide produisant le siRNA sont utilisées pour nourrir les vers. Une approche fonctionnelle complète du génome par RNAi est ainsi réalisable en 20 semaines, en pratique il travaille sur un jeu de 4310 gènes à valeur pharmacologique (canaux ioniques, protéines kinase....).

Un des exemples présenté concerne un phénotype assimilable à l'obésité et lié à une résistance à l'insuline observée chez un mutant dont le récepteur à l'hormone est affecté (observé dans le diabète de type II). Chez ce mutant, une catégorie de cellules adultes bien définies accumulent des acides gras. Le crible réalisé a permis d'identifier des gènes capables d'inhiber ce processus. D'autres cribles portant sur les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), la pathologie polycystique du rein, l'arythmie cardiaque et la douleur ont été évoqués.

Bristol-Squibb Meyer, (B.A. Rupnow) en collaboration avec la société Exelixis (San Francisco, USA) utilise également une plate-forme *C.Elegans*/RNAi. Leur objectif est dans la ligne évoquée précédemment pour des cibles anticancer (III-2-1-1). La formation des tumeurs est liée à la prolifération dérégulée de cellules transformées sur la base d'une accumulation de plusieurs mutations. Il existe des défenses naturelles de la cellule assurée par des gènes dits 'suppresseur de tumeur', le mieux caractérisé correspond à la protéine p53. Sous l'effet d'un agent mutagène et si les dommages infligés au DNA sont limités, ce facteur est capable de bloquer le cycle cellulaire en phase G1 permettant aux systèmes de réparation du DNA d'intervenir, si ces

altérations sont trop importantes, la p53 induit la mort cellulaire (apoptose) prévenant le risque d'une accumulation de mutations dans cette cellule. L'analyse d'un grand nombre de cancers a montré que l'activité de la p53 est très souvent inhibée ce qui permet d'expliquer la résistance de ces tumeurs à des traitements chimio ou radiothérapeutiques. Ce mécanisme est conservé chez les eukaryotes supérieurs et a été analysé chez *C.Elegans* où la perte de l'activité de la p53 (chez un mutant nul) inhibe la réponse apoptotique. Un cribble RNAi, réalisé sur le même principe que chez *Devgen*, a permis d'identifier des gènes dont l'inhibition restaure la réponse apoptotique (les cellules apoptotiques sont directement visualisées avec un marquage spécifique). Ces gènes correspondent à des protéines kinases de la famille ApoK, deux de ces protéines sont en aval de la voie de signalisation contrôlée par p53 et agissent de manière séquentielle en phosphorylant un substrat(s) impliqué dans l'induction de l'apoptose. Exelixis utilise également la *Drosophile* comme modèle, un mutant de la p53 est utilisé pour un cribble (des altérations de l'aile dont la morphologie est utilisée comme phénotype sont analysées). Non seulement l'utilisation de cet autre modèle a permis de réidentifier les deux orthologues de ApoK mais une troisième kinase de cette famille a pu être caractérisée confirmant la conservation des voies de signalisation contrôlées par la p53 et bien sûr la validation des gènes ApoK en tant que cibles. Néanmoins le modèle *Drosophile* se prête moins à une approche haut débit avec une analyse phénotypique plus difficile et complexe au niveau cellulaire et tissulaire.

III-2-2. Le RNAi appliqué à la validation de cibles pharmacologiques.

Les exemples présentés montrent deux niveaux de validation possibles à l'aide du RNAi, au niveau cellulaire (en culture) et *in vivo* (avec un modèle invertébré comme *C.Elegans*). Bien entendu la validation ne peut reposer sur une seule approche et doit être le résultat de données convergentes. Il est important, en particulier si le gène cible est issu d'un cribble 'invertébré', de tester l'inactivation de son orthologue humain dans un système cellulaire approprié (c'est à dire le gène le plus proche en terme de séquence avec une conservation relative de sa position supposé posséder des fonctions similaires).

Amgen (Ren Y. Xu) une importante entreprise de biotech aux USA avec trois centres de recherche dont le plus important en Californie (San Francisco) a développée une plate-forme automatisée à haut débit pour le test de siRNA sur cultures. Le système basé sur des cultures en plaques permet en particulier de tester de multiples conditions de transfections pour chaque type

cellulaire utilisé et d'opérer séquentiellement différentes analyses : quantité de RNA présente, cytotoxicité, etc...

Si la validation à l'aide d'un mutant invertébré est une information forte, la disponibilité d'un mutant mammifère souris fournit le niveau de confiance le plus important. La création d'un mutant nul par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires reste un protocole lourd et long mais la récente application du RNAi à la création de mutant chez la souris pourrait apporter dans certains cas un gain de temps considérable. J.Rossant (Université Toronto, Canada) introduit une construction exprimant un siRNA spécifique dans une cellule souche embryonnaire, une évaluation phénotypique directe peut être ensuite réalisée sur un embryon dérivé de ces cellules souches par agrégation tétraploïde (Nature Biotechnology, mai 2003, 21, 559-561).

III-3. Le siRNA comme agent thérapeutique.

Les modèles expérimentaux évoqués (III-1-3 et III-2-2-2) montrent la possibilité d'utiliser les siRNA comme agent thérapeutique de manière directe, en particulier sur les modèles vertébrés. Les résultats présentés correspondent à des stratégies à divers stades de développement et soulignent que l'outil 'RNAi' permet d'aborder potentiellement une large gamme de pathologies, particulièrement celles pour lesquelles une approche pharmaceutique conventionnelle (petites molécules, anticorps) n'est pas possible. Parmi les éléments favorables il est important de noter que la durée d'action prolongée d'un siRNA permet une utilisation pratique avec des intervalles suffisamment longs. Un des problèmes majeurs reste lié à l'administration des siRNA qui puisse être supportée par le patient tout en étant efficace vis-à-vis des cellules ou de l'organe visé. Parmi les différentes applications thérapeutiques envisagées il est important de noter que l'outil RNAi pourrait être combiné avec une thérapie cellulaire dans certaines pathologies.

III-3-1 Cancer.

Les bases du cancer sont complexes et correspondent à la dérégulation de l'activité de plusieurs gènes, des agents infectieux de type viral peuvent contribuer à l'initiation ou au développement de la pathologie. Fonctionnellement deux classes de gènes apparaissent impliqués : d'une part les oncogènes dont la modification de l'activité normale contribue à l'initiation et/ou la maintenance

du phénotype transformé (par exemple des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire) et des gènes dits ‘suppresseur de tumeur’ dont le gène de la p53 précédemment évoquée est le mieux connu et qui n’assurent plus leur rôle dans une tumeur face à une prolifération anormale.

La caractérisation progressive des gènes impliqués, d’identité très variable, dans les différents types de tumeurs permet de définir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

- R. Agami, Netherlands Cancer Institute Centre (Hollande) travaille sur deux cibles :

La version oncogénique du gène K-ras a été caractérisée dans de nombreux carcinomes (pancréas, colon..., la mutation correspond au changement d’un seul acide aminé). La protéine K-ras assure la transduction de signaux extracellulaires et la forme oncogénique présente une activité constitutive impliquée dans la dérégulation de la prolifération et la progression tumorale. L’objectif est de bloquer ce processus, il n’existe pas de médicaments sélectifs contre la forme mutée de K-ras et l’inhibition de l’allèle, non muté, est toxique pour les cellules. Un siRNA complémentaire du RNA dans une région couvrant la mutation est capable de bloquer la formation de tumeurs in vitro et in vivo (après transfert dans des ‘nude mice’). Cet exemple montre la puissance de l’outil, avec un seul nucléotide de différence le siRNA dirigé contre le RNA de la forme muté n’interfère pas avec le RNA de l’allèle sauvage.

Face à la variété des gènes impliqués dans les multiples cancers une des stratégies employée est de cibler des gènes qui soient le plus largement possible ‘partager’ entre les différents types de tumeurs. Dans de nombreux cas les cellules tumorales présentent une activité enzymatique télomérase absente des cellules saines. Cette enzyme est directement impliquée dans le processus tumoral puisqu’elle est suffisante avec un nombre limité de gènes dont la p53 pour l’induire. En effet la télomérase conditionne la capacité des cellules à poursuivre leur division, la réplication du DNA n’est jamais complète et la télomérase est capable de compléter la synthèse de l’extrémité des chromosomes (les télomères) et assure ainsi le maintien de la structure du chromosome, sans télomérase à chaque cycle le chromosome se raccourcit jusqu’à une taille critique qui n’autorise plus de division. Les cellules qui perdent l’activité télomérase perdent donc également leur capacité de division après un certain nombre de cycles.

Dans cette logique de premiers résultats encourageants montrent que l’utilisation d’un siRNA dirigé contre la télomérase dans les cellules transformées inhibe la croissance tumorale.

La société Ribopharma (Von Locker) travaille sur plusieurs gènes. L’inhibition du gène Bcl2, (sous contrôle de la p53) rend les cellules plus ‘sensibles’ à l’apoptose et inhibe la croissance de tumeur de types mélanome malin et carcinome pancréatique non seulement in vitro mais

également in vivo sur des tumeurs murines induites (Xénografts). D'autre part des résultats encourageants ont été observés après inhibition de la protéine fusion oncogénique Bcr-Abl suivi du blocage de la progression du myélome chronique associé.

Benitec (K.C. Reed, Australie) développe des vecteurs de type rétrovirus exprimant un siRNA, ils s'intéressent à l'induction de l'apoptose des cellules transformées. Une estimation indique que l'activité de la p53 est réprimée dans 52% des cancers et que dans 6% des cas le facteur de transcription YB-1 est impliqué dans cette répression, ils valident cette cible en observant après inhibition de YB-1 l'augmentation du niveau de p53 suivie d'apoptose.

III-3-2. Maladies virales

- HIV, virus du 'sida'.

Ce virus maintenant largement propagé est devenu un problème majeur de santé humaine surtout en Asie et en Afrique. Les thérapies pharmacologiques disponibles restent d'une efficacité encore limitée et sont coûteuses. L'utilisation de l'outil RNAi ouvre certaines perspectives.

- J.Rossi (Beckman center, City of the Hope, Duarte, Californie) a développé une stratégie basée sur l'utilisation d'un vecteur lentiviral (rétrovirus) recombinant possédant un tropisme pour les cellules souches du système hémopoïétique à l'origine des cibles du HIV : lymphocytes T, monocytes et macrophages. Ce vecteur, défectif, ne peut se reproduire dans la cellule hôte, il s'intègre à son génome et exprime un siRNA de manière stable (synthétisé comme un shRNA puis mûré en siRNA par le DICER).

Les différents gènes viraux impliqués dans la réplication du HIV sont maintenant bien caractérisés, Les tests menés sur des cultures primaires de monocytes, macrophages et lymphocytes primaires ont permis de montrer que l'inhibition des gènes tat et rev (régulateurs de la transcription virale) bloque de manière stable la réplication virale et constituent les meilleures cibles (Figure 2 p 21).

Les caractéristiques de ces vecteurs rendent cependant difficile une utilisation directe in vivo car les taux d'infection et d'intégration des lentivirus sont faibles d'autre part le HIV, dont le génome correspond à une molécule de RNA s'intègre après infection sous forme de DNA dans la cellule et peut rester à l'état latent jusqu'à une 'activation' de la cellule infectée déclenche sa réplication. Dans cette phase de latence, en l'absence de RNA viral il n'y a pas d'action thérapeutique possible, quand la réplication du HIV démarre alors la dégradation effective du RNA viral qui est présent en multiples copies devient alors très difficile.

L'utilisation du RNAi avec ces vecteurs se prêtent plus à des thérapies cellulaires ; un protocole est en cours de validation avec le babouin (Univ. de Washington) : après infection des cellules souches hémopoïétiques prélevées dans la moelle osseuse, les cellules exprimant de manière stable le siRNA sont sélectionnées et transplantées chez le patient (greffe autologue), des lymphocytes T et des macrophages résistants de manière stable au HIV sont alors produits.

- Premlalta Shankar (Center for blood research, Boston) a développé une stratégie similaire avec le même type de vecteur, il cible non seulement l'étape de réplication virale mais la phase d'infection et d'intégration dans la cellule cible (Figure 2 p21). L'infection est liée à la reconnaissance par le virus du récepteur CD4 et du corécepteur CCR5. Dans les macrophages primaires en culture infectés par un vecteur exprimant un siRNA dirigé contre CCR5, ce gène apparaît comme une très bonne cible thérapeutique avec une résistance à l'infection en culture de trois semaines sans effets parallèles (de plus ces cellules sont sensibles au virus déficient même après son infection par le HIV). De manière intéressante l'inhibition de CCR5 combiné à l'utilisation d'un siRNA dirigé contre le RNA du virus présente un effet synergistique avec un blocage complet de l'infection, de la réplication et de la formation du virus. Une thérapie cellulaire basée sur l'obtention de lymphocytes et de macrophages dérivés de cellules souches hémopoïétiques infectées par un lentivirus recombinant et résistants de manière permanente à l'infection par HIV est également présentée.

- HBV, virus de l'hépatite B :

La société Nucleonics (C.Satischandran) utilise comme vecteur un plasmide qui contrôle la synthèse d'un siRNA. L'administration du vecteur (neutre physiologiquement in vivo, III-1 accessibilité, vecteur) est réalisée par injection intraveineuse ou intramusculaire sur le lapin, une inhibition prolongée des gènes testés accompagnée du blocage de la réplication virale ont été observés. Ces résultats ont été confirmés avec des outils similaires à l'Université de Stanford (Medical School). La société travaille sur un protocole d'administration orale.

- HCV, Virus de l'hépatite C.

Ce virus peut en particulier contribuer au développement d'un carcinome hépatique. FV Chisari du Scripps Research Institute (La Jolla, USA) a bloqué la réplication du virus in vitro dans des lignées cellulaires hépatiques.

- HPV, virus du papillome humain.

Ce virus à l'origine du cancer cervical chez la femme induit un fort taux de mortalité chez les personnes infectées. J.Milner, University de York, (UK) a développé un modèle cellulaire in

in vitro permettant d'analyser le cycle viral. Des interactions entre certaines protéines virales et la p53 cellulaire ont été caractérisées, l'inhibition sélective de la protéine E7 permet d'induire de manière sélective l'apoptose des cellules infectées.

IV. Conclusions.

Les avantages bien établis de la technologie 'RNAi' ont clairement eu un impact en recherche pharmaceutique. Les résultats obtenus par l'ensemble des sociétés qui ont investi dans cette voie, plus de 50 répertoriés aux USA dont beaucoup de petites biotech., ouvrent de larges perspectives dans ce domaine.

En application thérapeutique directe, le médicament 'RNA' (basé sur le 'RNAi') présente des avantages très spécifiques par rapport aux médicaments traditionnels mais l'application in vivo présente un certain nombre de problèmes à surmonter en particulier la distribution de siRNA dans les cellules cibles apparaît très hétérogène dans les systèmes présentés. L'administration efficace par voie orale ou systémique demande encore des développements importants. L'avenir des vecteurs quelqu'en soit le degré de sophistication sera lié aux résultats d'essais cliniques, l'utilisation de vecteurs de type rétroviral évoqué présente un risque intrinsèque (intégration dans le génome et activation d'oncogènes comme cela a été malheureusement le cas avec de récentes applications en thérapie génique).

Il convient enfin de garder à l'esprit une limitation intrinsèque de cette approche fonctionnelle, en effet elle ignore les étapes post-transcriptionnelles qui amplifient de manière considérable l'expression génique mesurée en nombre de RNA transcrits. En effet l'épissage alternatif (p3) et des modifications post-traductionnelles différentielles peuvent générer plusieurs protéines à partir d'un RNA initial. La spécificité d'une thérapie est liée, au moins en partie, au ciblage d'une protéine unique alors que, l'utilisation d'un siRNA peut conduire à 'l'inactivation' simultanée de plusieurs protéines avec des fonctions différentes.

Un nombre important d'essais cliniques sont en préparation ou initiés, bien qu'un certain optimisme soit de mise, seuls la qualité des résultats et la proportion de succès de ces tests décideront de l'avenir du médicament 'RNA'.

Annexes :**Liste (non exhaustive) de sociétés engagées dans des technologies RNA.****USA**

Alnylam (fusion avec Ribopharma)
AGY Therapeutics (San Francisco)
Ambion Inc.
Amgen Corp. (San Francisco)
Bristol-Myers Squibb
Dharmacon Research Inc. (Colorado)
Exelixis (San Francisco)
Galapagos Genomics
Genta Inc. (Berkeley, Californie)
Hybridon
Isis Pharmaceuticals (San Francisco)
Mirus Corp.
Nucleonics
Pharmacia
Promega Corp (Wisconsin)
Sequitur Inc.
Sirna Therapeutics (ex Ribozyme Pharmaceuticals, Colorado)

Europe /Autres

Aventis Pharma (France-Allemagne)
Benitec (Australie)
Cenix Biosciences (Allemagne)
Devgen (Belgique)
Quiagen (Allemagne)
Ribopharma (Allemagne)

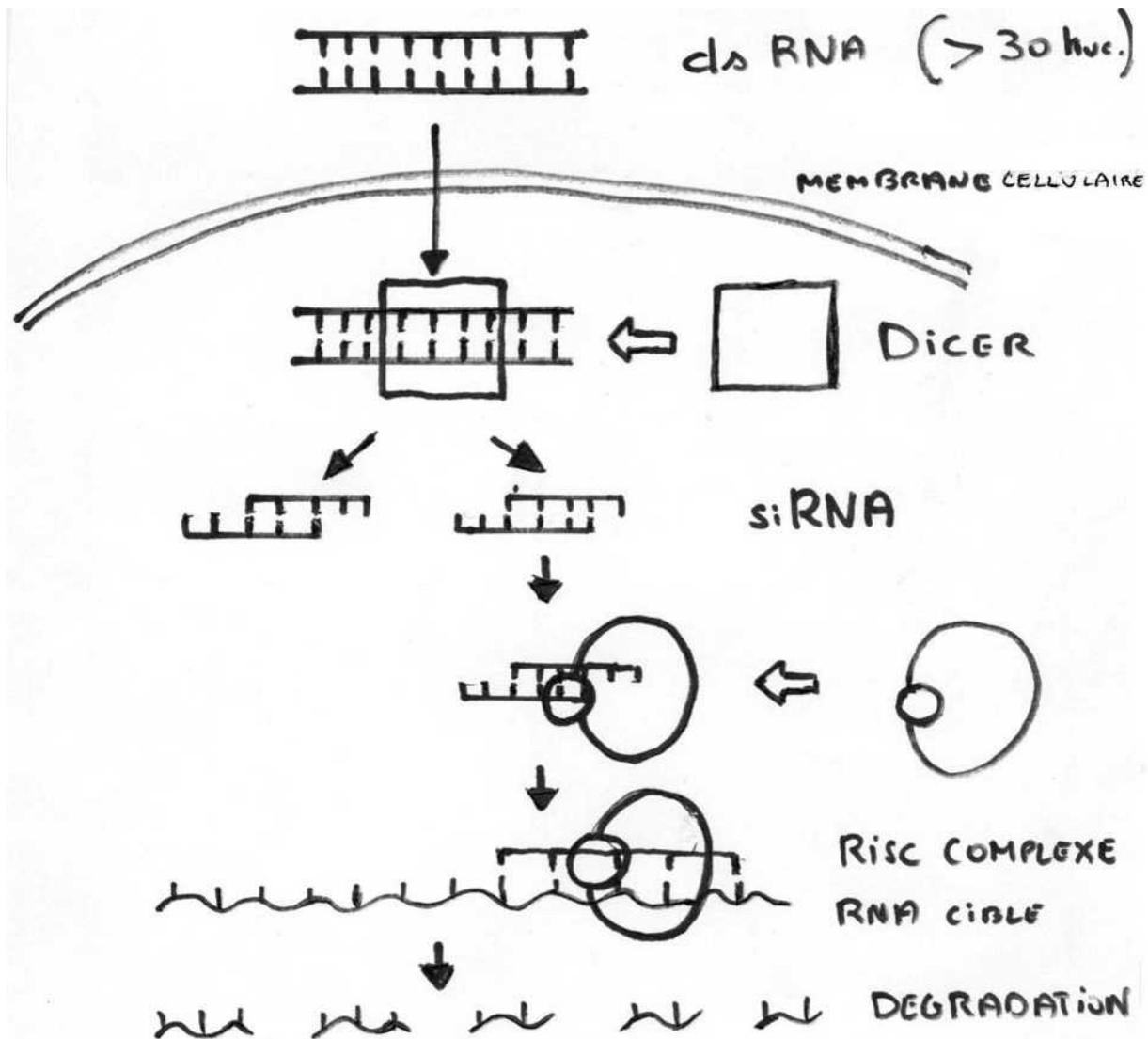


Figure : 1 : Mécanismes du 'RNA interference'.

Une molécule RNA double brin (dsRNA) de plus de 30 nucléotides (correspondant soit à un virus, soit fourni par l'expérimentateur) une fois entrée dans la cellule est reconnue par un complexe protéique (DICER) qui la fragmente en petits RNA.

Ces petits RNA appelés '**silencing RNA**', **siRNA** sont reconnus par le complexe (RISC). Ce complexe possède une activité hélicase qui permet, si un RNA messager avec une séquence complémentaire est présent, l'hybridation du siRNA à ce RNA. L'hybride formé est sensible alors à une activité RNase qui conduit à la dégradation du RNA.

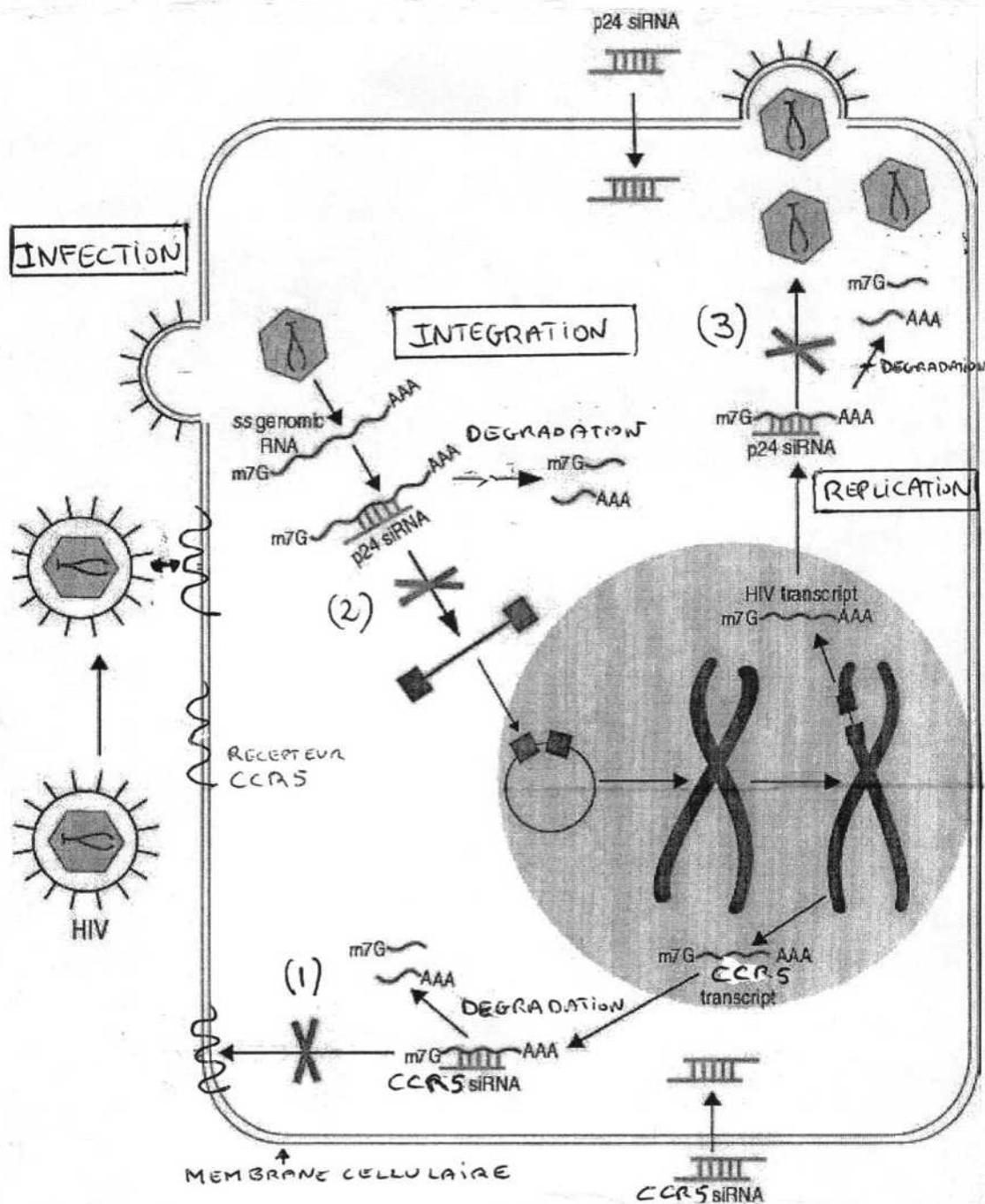


Figure 2 : Les cibles thérapeutiques antiHIV.

Trois étapes dans le cycle du virus peuvent être ciblées : **l'infection**, **l'intégration** et la **réplication**. Une inhibition efficace de **l'infection** (1) de cellules en culture peut être obtenue en utilisant un siRNA dirigé contre le RNA de CCR5 un récepteur cellulaire au virus. **L'intégration** (2) et la **réplication** (3) peuvent être bloqués à l'aide d'un même siRNA (p24) dirigé contre le génome du virus qui correspond à une molécule de RNA, (le génome est libéré de la capsid avant la phase de conversion RNA-DNA et l'intégration dans le génome cellulaire ; le RNA viral réapparaît lors de la phase de **réplication** où il est transcrit à partir de la copie DNA intégrée).