

Structure et fonction de l'ARN interférence (molécule d'importance biologique, thérapeutique et industrielle).

BOUHANNA Imène.

Abstract :

Pour pouvoir étudier la relation structure -fonction , je me suis intéressée à une molécule qui a en même temps, un intérêt biologique, thérapeutique et industriel. Plusieurs recherches ont été menées pour le développement de ce sujet .ce qui m'a permis de réaliser ce travail en faisant une synthèse de plusieurs articles pour rédiger un article revue.

Mots clés : ARN interférence ; gène dicer1

Abréviations : ARNi ,ARN interférence ; ddRNAi ,DNA- directed RNAi ; AMD,la dégénérescence maculaire liée à l'âge ; neor ,une résistance à la néomycine ; Lignées de cellules ES, embryonnaires souches ; VEGF (facteur de croissance endothélial vasculaire) ;VSV ,la stomatite vésiculeuse pathogène chez les mammifères virus .

I- Introduction :

ARNi a été déjà identifié en 1990 sur des plantes et en 2001 chez les mammifères, permet d'inhiber l'expression des gènes mutés par un mécanisme Original. (siRNA) induit la dégradation d'un ARN messager (ARNm), empêchant ainsi la synthèse de protéines. Ce mécanisme servirait à la cellule à réguler l'expression de ses propres gènes, mais également à lutter contre des infections virales. L'ARN interférence s'est imposé comme une technique de choix pour l'étude de la fonction des gènes, l'identification de cibles, mais également en tant qu'agent Thérapeutique pour inactiver un gène mis en cause dans une maladie ou bloquer la réplication virale. Sur ce plan, les espoirs fondés sont grands, tant pour le traitement de maladies complexes telles que le cancer, le diabète ou le sida, par exemple, que pour des pathologies localisées, oculaires ou dermatologiques.

II-matériel et méthodes :

II-1- ARN interférents, une nouvelle classe de médicaments :

Des stratégies variables :La 1^{ère} technique c'est l'utilisation de vecteurs codant les ARN interférents, des vecteurs antiviraux que pour valider des cibles thérapeutiques in vivo . Les chercheurs pensent que cette technique devra faire face aux mêmes problèmes réglementaires et techniques que la thérapie génique. , de ce fait ils préfèrent

s'orienter vers l'utilisation de molécules synthétiques, soit formulées dans des liposomes - approche qui semble la plus efficace -, soit nues. la stabilité des siRNA et leur protection vis-à-vis des nucléases se fait en introduisant des modifications chimiques sur leur squelette carboné.

-La 2ème technique utilisée ,est celle des ddRNAi (DNA- directed RNAi) dans laquelle des constructions d'ADN codent des ARN double brin qui sont coupés dans la cellule pour devenir des siRNA

Tests bientôt chez l'homme : concernant la dégénérescence maculaire liée à l'âge (AMD) . la délivrance des siRNA pourra se faire localement, dans l'oeil, et non par voie sanguine. Ce qui représente un avantage non négligeable. ,il reste cependant à le démontrer par des essais cliniques .

. En dehors de l'AMD, certaines maladies plus complexes, comme le cancer, le diabète

II-2-L'élaboration d'un nouveau traitement : l'ARNi contre le VIH :

Pour montrer le mécanisme d'inhibition (voir figure 1) :l'ARNi se fixe spécifiquement sur une partie de l'ARNm et provoque sa

ou le sida, sont également sur la ligne de mire. Pour International Thérapeutiques, c'est le traitement du sida qui offre le meilleur champ d'action pour tester l'ARNi. Les cellules ciblées, les lymphocytes, peuvent en effet être traitées in vivo par des siRNA et réintroduites chez le patient .

- Le cancer est le domaine idéal pour un développement rapide des siRNA. Des chercheurs ont développé des nanoparticules ciblant spécifiquement les sites de néoangiogenèse et contenant des inhibiteurs de la voie du VEGF (facteur de croissance endothélial vasculaire) qui ont donné de bons résultats ,mais il faudra certainement attendre la preuve de la non- toxicité des siRNA sur l'homme et aussi montrer leur efficacité clinique. »

destruction .La protéine ne pourra plus être synthétisée .

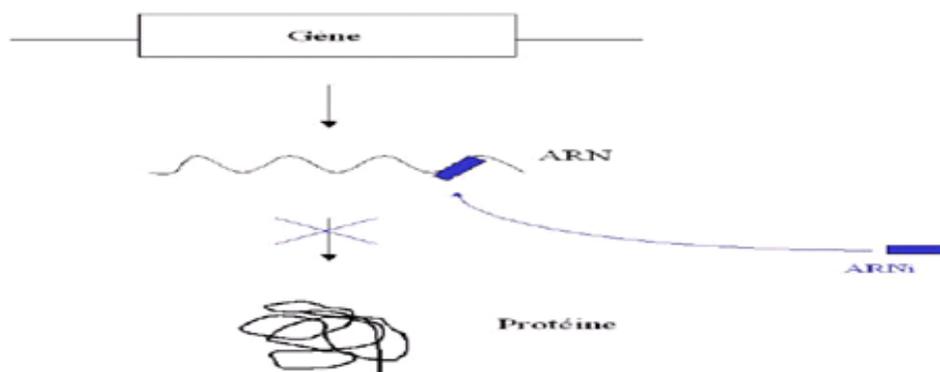


Figure 1 : Le blocage de la synthèse protéique par l'ARN interférence .Ref.[2]

Les chercheurs ont alors eu l'idée d'imiter ce mécanisme contre le VIH .Leur travail a permis de mieux maîtriser ce processus et de l'adapter ensuite aux traitements des maladies. Il est en effet possible de concevoir des ARNi sur mesure, susceptibles de bloquer l'expression de certains gènes du VIH (figure2)

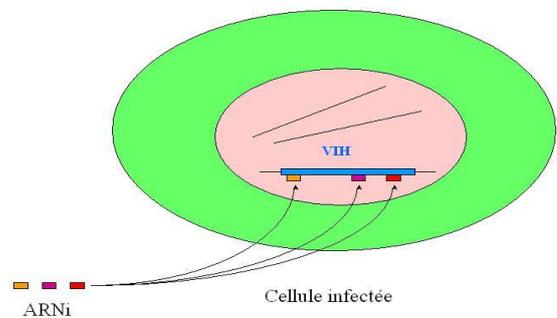


Figure2 : des ARNi sur mesure, susceptibles de bloquer l'expression de certains gènes du VIH.Ref.[2]

On peut développer d'ailleurs plusieurs ARNi pour bloquer plusieurs gènes du VIH afin d'être plus efficace. En effet, comme pour les molécules antivirales, des mutations peuvent conduire à la résistance virale. Il est donc nécessaire d'associer différents ARNi, capables d'inhiber l'expression de différents gènes du VIH afin de bloquer durablement la réplication virale.

Si des virus multi résistante émergent. On peut aussi concevoir la combinaison de nouveaux ARNi capables d'interagir sur des cibles différentes. La réplication virale est à nouveau bloquée et. De ce fait, le traitement peut être durablement prolongé.

Une nouvelle question s'est posée aux chercheurs. Si le mécanisme est efficace

théoriquement, comment néanmoins cibler spécifiquement la cellule infectée chez les personnes séropositives ? Pour être efficaces, les ARNi doivent en effet être délivrés en quantité suffisante dans les seules cellules infectées par le VIH. Autrement, ils seraient toxiques pour les cellules environnantes.

Tout d'abord la mise au point d'un moyen pour introduire des ARNi dans les principales cellules cibles du VIH : les lymphocytes T. Pour ce faire, l'ARNi est attaché à une « tête chercheuse » (anticorps) qui va reconnaître un élément exclusivement présent à la surface des lymphocytes T (le CD7). Une fois la cible repérée l'ARNi pénètre dans la cellule puis bloque les gènes du VIH (figure 3)

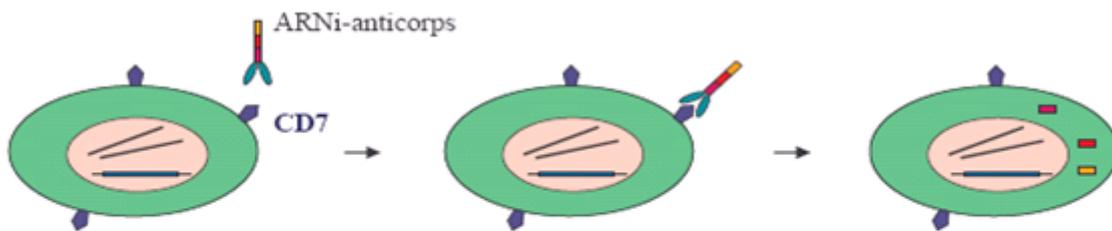


Figure 3 : Ciblage des ARNi sur les lymphocytes T. Ref. [2]

Pour le moment les essais n'ont été effectués que sur des souris de laboratoire. Mais les premiers résultats ont été plus que satisfaisants : les auteurs ont montré que le ciblage spécifique d'un mélange d'ARNi sur les lymphocytes T bloquait durablement la réplication virale du VIH. Et dans ces études aucun effet toxique des ARNi n'a été observé.

Ces résultats constituent une étape importants dans le traitement du SIDA. Cependant, de nombreuses avancées techniques paraissent encore nécessaires pour espérer une application à l'homme. Il s'agit par exemple d'améliorer l'efficacité du

ciblage, de développer d'autres « têtes chercheuses » pour repérer des cellules infectées par le virus VIH autres que les lymphocytes T, ou encore de stabiliser les ARNi afin de maintenir le plus longtemps possible leur action.

Pour toutes ces raisons, les ARNi n'ont pas vocation à remplacer un jour les multi thérapies. Mais lorsque celles-ci seront inopérantes, notamment à cause des multi résistances fréquentes, le rôle des ARNi sera probablement de prendre efficacement le relais.

II-3-Le gène *dicer1* est essentiel pour le développement des Souris :

-Pour répondre à la fonction biologique de l'interférence ARN (RNAi) - voies associées chez les mammifères, les chercheurs ont perturbé le gène *Dicer1* chez la souris. La perte de *Dicer1* conduit à la perturbation de leur développement.

-l' implication, de la machinerie RNAi, dans le maintien de la population de cellules souches embryonnaires [ES] au cours du développement précoce de la souris.

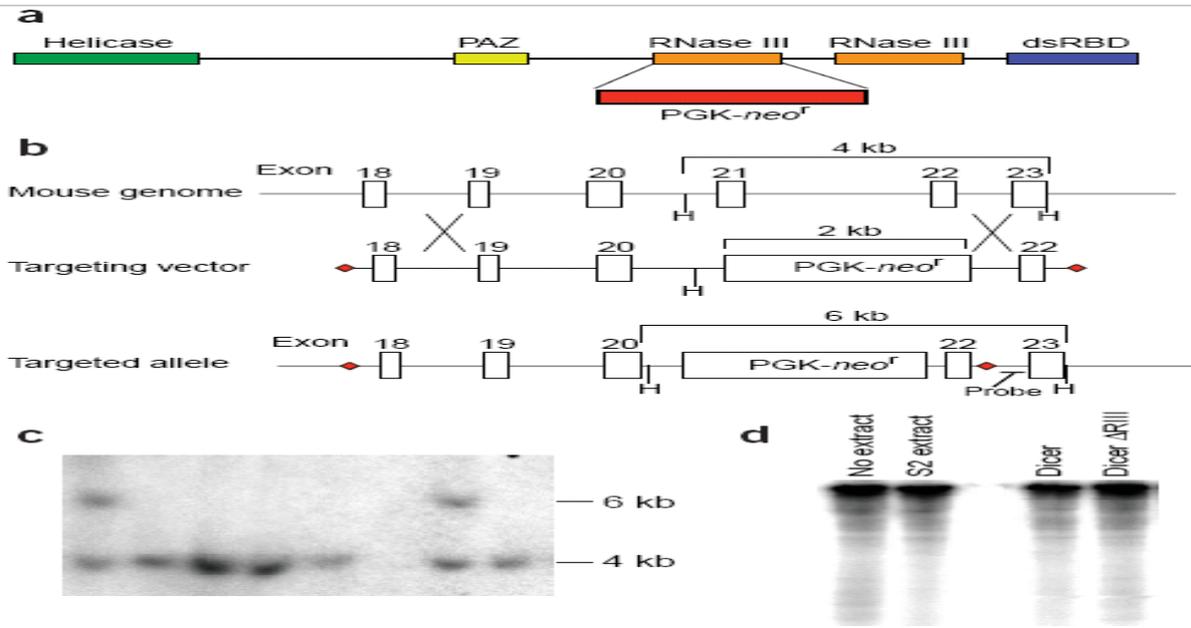


Figure 3: La destruction du gène *Dicer1* dans les cellules souches embryonnaires(ES) Des souris.Ref.[1]

-Les diamants rouges indiquent les limites de la région d'homologie dans le vecteur de ciblage : schéma (b)

- Comparaison de type sauvage (*Dicer*) et mutantes (*Dicer* Δ RIII) des protéines témoin ,en remarque un manque de production siARN par le mutant : Schéma (d).

lésion chromosomique dans le gène *Dicer1*. Pour préparer un gène-vecteur de ciblage pour *Dicer1*, on utilise une recombinaison in vivo (Lignées de cellules ES contenant recombinants homologues qui ont été identifiés par transfert de Southern avec une sonde provenant de régions extérieures au vecteur de ciblage « indiquer en b ») pour remplacer l'exon 21 de *Dicer1* avec une résistance à la néomycine (*neoR*) cassette (Fig. 1a, b). Épaisseur des sites donneur et accepteur de l'exon est restée intacte, ce qui augmente la chance que la cassette entière *PGK-neoR* serait incorporée dans le *Dicer1* transcription, la production s'arrête dans les trois cadres de lecture.

Jusqu'à présent, les stratégies génétiques ont été utilisés pour les examens biologiques. on commençons à évaluer les rôles biologiques de l'ARNi chez les mammifères par la création d'une souche de souris avec une

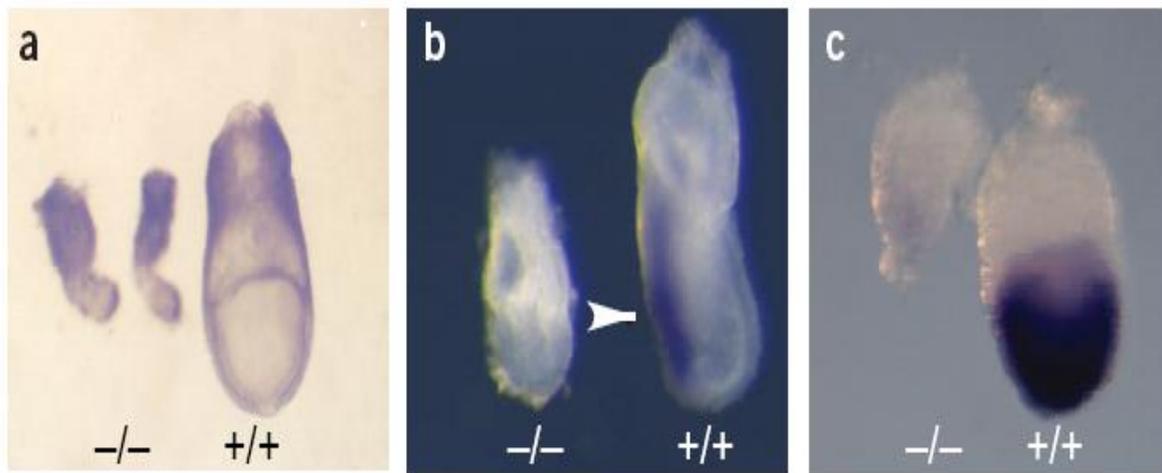


Figure 4 :Montrer le développement des Souris en comparant type sauvage et mutant. Ref.[1]

Figure 4: Caractérisation des Dicer1 mutant embryos. (a) E7.5 typiques (-/-) mutants et de type sauvage (+/+) embryos sont montrées pour morphologiques comparaison. (b) Mutant (-/-) et (+/+) de type sauvage embryos ont été colorées par hybridation in situ avec une sonde pour T (brachyury), une ligne primitive marqueur. (c) Mutant (-/-) et (+/+) de type sauvage embryos ont été colorés avec une sonde pour Oct4, un marqueur de populations de cellules souches au début d'embryon.

II-4-RNA interférence est un mécanisme de défense antiviral chez les Caenorhabditis elegans:

L'interférence ARN (ARNi) mécanisme de silençage génique qui est bien définies chez (Caenorhabditis elegans). ARNi a été postulé pour fonctionner comme un mécanisme immunitaire adaptative antiviraux . Nous décrivons ici un modèle d'infection dans les C. elegans l'aide de la stomatite vésiculeuse pathogène chez les mammifères virus (VSV) un virus enveloppé avec un nonsegmented, sens négatif génome ARN ,

a été un candidat intéressant : pour étudier le rôle de l'ARNi dans l'immunité antivirale. VSV

infection est potentialisée dans des cellules

dérivées du ver de RNAi-défectueux mutants (rde-1; rde-4), conduisant à la production des maladies infectieuses descendance virus, et est inhibée dans les mutants avec une amélioration de RNAi réponse (FRR-3; eri-1). Parce que la réaction se produit dans le RNAi absence de source exogène VSV petits ARN interférents, ces résultats montrent que l'ARNi est activé lors de l'infection VSV et que L'ARNi est un véritable mécanisme de défense antivirale immunitaire dans le ver

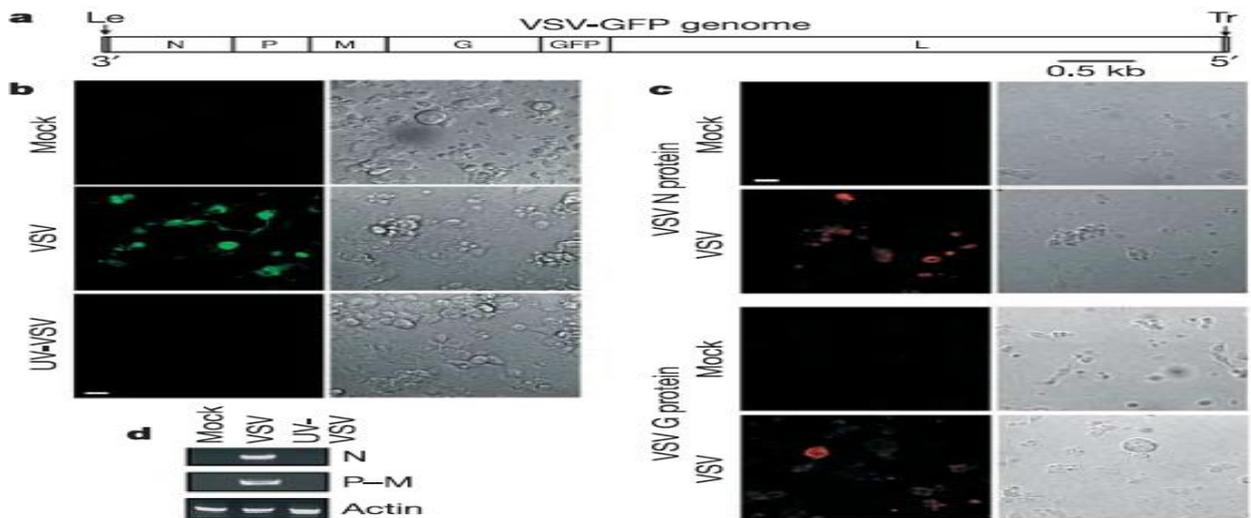


Figure 5 : Immunofluorescence des cellules pour VSV-N ou des protéines VSV-G. .Ref.[4]

Figure 5 : | infection par le VSV des cellules de *C. elegans* en culture. a, Génome organisation de VSV-GFP virus recombinant. Les protéines structurales de la Virion VSV sont : la nucléocapside (N), la phosphoprotéine (P), la matrice (M), glycoprotéine (G) et la réplicase virale (L). b-d, cellules, maquette ou malades avec VSV-GFP ou UV inactivé par VSV-GFP (UV-VSV), ont été analysés à 48 h après l'infection. La barre d'échelle, 7 mm. b, images fluorescence de la GFP (à gauche) et images de contraste interférentiel différentiel (à droite) de cellules. c, Immunofluorescence des cellules pour VSV-N ou des protéines VSV-G. d, RT-PCR. Les analyses par PCR des séquences de gènes N, P to M intergénique région de la VSV génome de *C. elegans*

III- Résultats et discussion :

L'utilisation des ARNi dans différentes stratégies a montré leur rôle important dans le domaine biologique[1]et[4] et aussi thérapeutique[2]et[3]. Plusieurs hypothèses ont été postulées, des recherches en ont été menées sur le plan tant théorique qu'appliqué, et aussi des expériences sur des souris, *C. elegans* etc....

L'implication de la machinerie ARNi dans plusieurs expériences a montré des résultats satisfaisants suivants :

- Pour être efficaces, les ARNi doivent en effet être délivrés en quantité suffisante dans les seules cellules infectées par le VIH. Autrement, ils seraient toxiques pour les cellules environnantes.[2] donc il faudra certainement attendre la preuve de la non-toxicité des siRNA sur l'homme et aussi montrer leur efficacité clinique. [3]

-La question que l'on se pose est : comment peut-on stabiliser les ARNi afin de maintenir le plus longtemps possible leur action ?.[3]

-Pour le moment les essais n'ont été effectués que sur des souris de laboratoire. Mais les premiers résultats ont été plus que satisfaisants : les auteurs ont montré que le ciblage spécifique d'un mélange d'ARNi sur les lymphocytes T bloquait durablement la réplication virale du VIH. Et dans ces études aucun effet toxique des ARNi n'a été observé.[2]

-L'implication, de la machinerie RNAi, dans le maintien de la population de cellules souches embryonnaires [ES] tel qu'on l'a montré par une perturbation du gène *dicer 1* qui a induit un retard de développement des souris[1]

Cependant, je pense que de nombreuses avancées techniques sont encore nécessaires pour espérer une application à l'homme.

IV-Conclusion :

Les siRNA pourraient devenir la plus grande classe de nouveaux agents thérapeutiques après les protéines recombinantes et les anticorps monoclonaux car ce sont des molécules à la fois, efficaces et faciles à développer et Simples à synthétiser, A mi-chemin entre la molécule chimique et la molécule biologique. Ils sont un atout pour les sociétés pharmaceutiques, notamment parce qu'elles

sont introduites, dans la cellule, par un complexe protéique nommé RISC qui les protège et surtout améliore leur spécificité. C'est là que réside toute la différence avec d'autres molécules thérapeutiques.

« Les laboratoires pharmaceutiques sont aujourd'hui tout à fait convaincus des potentiels de cet outil, mais ils restent pour l'instant à attendre les premières preuves d'efficacité sur l'homme. »

V-References :

- Article:[1]Dicer is essential for mouse development:2003 nature publishing

Emily Bernstein^{1,2}, Sang Yong Kim¹, Michelle A Carmelli^{1,2}, Elizabeth P Murchison¹, Heather Alcorn³, Mamie Z Li⁴, Alea A Mills¹, Stephen J Elledge⁴, Kathryn V Anderson³ & Gregory J Hannon¹

-Article :[2] L'élaboration d'un nouveau traitement :l'ARNi contre le VIH Kumar P et collaborateurs, T cell-specific SiRNi contre le VIH-

1 infection in humanized mice. [Cell. 2008 Aug 22 ;134\(4 \):577-86.](#)

-Article :[3]ARN interférents, une nouvelle classe de médicaments : 2004 par STÉPHANIE COHEN

-Article:[4]RNA interference is an antiviral defence mechanism in Caenorhabditis elegans: Courtney Wilkins¹, Ryan Dishongh¹, Steve C. Moore^{1,3}, Michael A. Whitt⁴, Marie Chow¹ & Khaled Machaca²/ Vol 436 | 18 août 2005 | doi: 10.103/nature03957