LES OLIGONUCLÉOTIDES ANTISENS : OUTILS DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE ET AGENTS THÉRAPEUTIQUES

J.-J. TOULMÉ, P. VERSPIEREN, C. BOIZIAU, N. LOREAU,
C. CAZENAVE, N. T. THUONG*

RÉSUMÉ

La fixation d'un oligonucléotide synthétique, appelé antisens, sur la séquence complémentaire d'un ARN messager choisi pour cible peut conduire à l'inhibition de la synthèse de la protéine correspondante. Il s'agit donc là d'un moyen de réguler artificiellement et de façon spécifique l'expression du gène cible. Deux mécanismes rendent compte de cet effet : d'une part un blocage physique de la progression du ribosome prévient l'initiation de la traduction, d'autre part la dégradation de l'ARNm associé à l'oligonucléotide antisens par les RNase-H empêche l'élongation de la chaîne peptidique. Des modifications chimiques peuvent être introduites dans ces molécules afin de leur conférer des propriétés

particulières (résistance aux DNases, haute affinité, pénétration facilitée dans les cellules vivantes). Les oligonucléotides antisens, outils de génétique moléculaire, ont aidé à la caractérisation de la séquence mini-exon, acquise par trans-épissage, présente à l'extrémité 5' de tous les ARNm de trypanosomatidés et à celle de quelques ARNm de nématodes. De plus, des oligonucléotides antisens modifiés, complémentaires de cette séquence mini-exon induisent la mort de *Trypanosoma brucei* en culture; ces molécules pourraient donc constituer des prototypes d'une nouvelle classe d'agents thérapeutiques.

SUMMARY: Antisense oligonucleotides: from tools in molecular genetics to therapeutic agents.

The binding of an oligodeoxynucleotide, so-called anti-sense, to the complementary sequence of a messenger RNA can prevent the synthesis of the encoded protein. This approach constitutes a very efficient and specific means to artificially regulate gene expression. Numerous chemical modifications have been introduced into synthetic oligos in order to provide them with properties that unmodified molecules do not display. For instance, oligos built up with methylphosphonate, phosphorothioate and α -anomer units (see *fig. 1*) lead to molecules that are resistant to DNases. Acridine-linked oligos exhibit an increased affinity for the target sequence due to the intercalation of the dye into the oligo/RNA duplex. Two different mechanisms account for translation inhibition by antisense oligos. Inhibition of the elongation step results only from the induced cleavage of the target RNA by RNase-H.

In contrast, oligos targeted upstream of the AUG initiation codon can block the initiation step through an RNase-H independent mechanism (*fig. 2*). As a consequence, methylphosphonate- and α -oligos, which do not elicit RNase-H activity, targeted to the 5' region, are efficient antisense; but they are inactive if targeted to the coding sequence. Experiments performed with antisense oligos in cell-free extracts supported the notion that the mini-exon sequence, acquired by trans-splicing, was present on every message in trypanosomatids and on some of them in nematods. Furthermore, an acridine-linked oligo complementary to the mini-exon sequence of *Trypanosoma brucei* induced a lethal effect on cultured procyclics. Therefore these compounds constitute promising tools in molecular genetics and could open new routes to rationally tailor therapeutic agents.

La stratégie antisens constitue une approche rationnelle pour la conception de régulateurs spécifiques de l'expression d'un gène. Elle repose sur la reconnaissance d'une séquence d'acide nucléique par la séquence complémentaire, appelée antisens. La formation d'un hybride entre l'antisens et l'acide nucléique cible va interférer avec l'une des étapes de l'expression du gène visé. Dès le milieu des années 70 cette idée a été exploitée avec des oligodésoxyri-

bonucléotides (désignés oligos dans la suite du texte) synthétiques [9, 13, 19]. La découverte d'ARN antisens naturels a augmenté l'intérêt pour cette approche [6, 11]. Depuis lors, de nombreux travaux y ont été consacrés. Deux voies sont empruntées. L'une, génétique, utilise des ARN antisens synthétisés *in vivo* puis microinjectés, ou produits *in situ* à partir d'un gène antisens. L'autre, chimique, fait intervenir des oligos synthétiques comportant éventuellement des modifications chimiques. Des succès (et des échecs!) ont été obtenus avec les deux types d'approche. Les aspects concernant les ARN antisens ont été décrits dans des revues récentes [5, 16]. Nous nous restreindrons ici à une présentation des oligos antisens (*fig. 1*).

Laboratoire de Biophysique, INSERM U201, CNRS UA481, Muséum National d'Histoire Naturelle, 43, rue Cuvier, 75005 Paris, France.

* Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, 45076 Orléans Cedex, France.

FIG. 1. — a) Structure de motifs oligonucléotides non modifié (phosphodiester) et modifiés. Le phosphore des dérivés phosphorothioates, méthylphosphonates et phosphorosélénates est asymétrique. L'introduction de n de ces résidus dans une chaîne génère 2ⁿ isomères. Le squelette phosphate-sucres des analogues α est inchangé par rapport aux oligonucléotides non modifiés mais la position de la liaison glycosidique est inversée. Les complexes oligo α /oligo β sont à brins parallèles par opposition aux complexes oligo β /oligo β qui sont à brins antiparallèles. Tous ces motifs portent une charge négative à l'exception des méthylphosphonates qui sont neutres.

b) Le groupement 2-méthoxy, 6-chloro, 9-aminoacridine est lié par un bras pentaméthylène à un phosphate terminal des oligos.

LES OLIGOS NON MODIFIÉS. RÔLE DE LA RNase-H

Un oligo, complémentaire d'un ARN messager, peut bloquer la traduction de ce message, c'est-à-dire la synthèse de la protéine correspondante. Une telle inhibition a été réalisée dans le cas de gènes procaryotes et de gènes eucaryotes, dans des extraits acellulaires et dans des cellules, micro-injectées ou en culture [14, pour revue]. En dépit des succès enregistrés avec les oligos antisens, les mécanismes par lesquels l'expression du gène cible est inhibée sont mal connus.

Des études réalisées avec des extraits acellulaires (extrait de germes de blé, lysat de réticulocytes de lapin) permettent d'invoquer deux modes d'action. Tout d'abord un oligo, fixé sur l'ARNm peut constituer un obstacle physique à la progression des ribosomes. En second lieu, l'hybride formé par un oligo et l'ARNm est un substrat pour les activités RNase-H. L'oligo induit ainsi la dégradation du messager cible qui ne peut plus être lu. Le rôle de la RNase-H a été clairement démontré dans les extraits de germe de blé d'une part, dans les ovocytes de xénope d'autre

part [1, 10]. Bien qu'il n'en existe pas de preuve directe, cette activité est certainement impliquée dans les effets antisens observés dans d'autres cellules eucaryotes.

LES OLIGOS MODIFIÉS

On peut introduire dans les oligos antisens des modifications chimiques pour autant que ces modifications n'altèrent pas la reconnaissance de la cible. Les chimistes ont synthétisé une série d'analogues afin de conférer aux antisens des propriétés dont les oligos conventionnels sont dépourvus, donnant ainsi naissance à des molécules de plus haute efficacité. Plusieurs familles de molécules ont été décrites qui tentent de pallier les problèmes *i)* de dégradation par les nucléases, *ii)* de faible affinité, *iii)* de pénétration médiocre dans les cellules intactes. Nous décrirons quelques résultats obtenus avec des molécules résistantes aux DNases et des oligos de haute affinité.

Oligos résistants aux DNases

Les dérivés méthylphosphonates (MP), phosphotriesters, phosphorothioates (PS), phosphorosélénates, oligomères α (fig. 1) répondent à ce critère. Nous avons réalisé une étude avec une série de 17-mères, dirigés contre la séquence codante (Sc) ou l'extrémité 5' (cap), de l'ARNm de la β -globine de lapin. Les oligos MP-Sc et α -Sc n'ont aucun effet sur la synthèse de β -globine de lapin dans les extraits de germe de blé. Les oligos PS-Sc et PSe-Sc sont actifs, tout comme l'oligo homologue non modifié [3, 12]. La différence entre les deux classes d'oligos tient au fait que les seconds induisent l'activité RNase-H alors que les premiers ne l'induisent pas. Pourtant un oligo α -cap est inhibiteur dans le même système de traduction *in vitro* (Boiziau et coll., résultats non publiés). L'ensemble de ces résultats permet de conclure quant au mode d'action des oligos antisens sur la traduction (fig. 2). Seule une intervention RNase-H peut bloquer l'élongation de la chaîne polypeptidique (oligos dirigés contre la région codante). Au contraire, un blocage physique suffit à interférer avec l'initiation (oligos complémentaires des régions en amont du codon AUG initiateur).

Les oligos PS qui allient résistance aux DNases et sensibilité de l'hybride aux RNase-H constituent donc des composés très intéressants en dépit de leur affinité forte pour les protéines et les membranes. Ainsi, une action catalytique de ces dérivés a été observée dans les ovocytes de xénope : une diminution de 50 % de la synthèse de β -globine a été induite par le 17-mère PS-Sc pour un rapport oligo/ARNm égal à 1/4 [3].

Oligos de haute affinité

Il s'agit d'oligomères liés à un agent intercalant : l'interaction de ce dernier avec les paires de bases de l'hybride oligo/ARNm stabilise ce complexe. Des oligos antisens cou-

FIG. 2. — Différents modes d'action des oligos antisens. *a*) En amont du codon AUG d'initiation de la traduction, les oligos peuvent constituer un obstacle physique à la progression du ribosome sur l'ARNm. C'est le seul mode d'action possible pour les oligos méthylphosphonates et α . *b*) A l'exception de ces deux types d'analogues, les hybrides oligos/ARNm sont des substrats pour les RNase-H. C'est le seul processus de blocage de l'élongation des polypeptides par des oligonucléotides qui n'introduisent pas de lésions permanentes, pontages, *c*) ou coupures, *d*) dans l'ARNm cible. Parmi les groupements pontants couplés à des oligos on trouve des agents alkylants et des photosensibilisateurs tels les psoralènes. Les complexes métalliques EDTA-Fe(II) et *o*-phénantroline-Cu(I) liés à un oligo induisent des coupures dirigées.

plés à leur extrémité 3' au 2-méthoxy, 6-chloro, 9-amino-acridine (Acr) (*fig. 1*) sont de meilleurs antisens que les oligonucléotides homologues non modifiés; ceci a été vérifié *in vitro* avec des oligos dirigés contre l'ARNm du gène 32 du phage T4 [15] et contre l'ARNm de la β -globine de lapin [2]. Dans tous les cas les effets sont spécifiques : des oligos (Acr) dont la séquence n'est pas complémentaire de l'ARN cible ne sont pas inhibiteurs.

OLIGOS COMPLÉMENTAIRES DU MINI-EXON DE *Trypanosoma brucei*

Nous avons pris pour cible la séquence de 39 nucléotides — le mini-exon — présente à l'extrémité 5' des ARNm de *T. brucei*. La traduction, en milieu acellulaire, d'ARN extraits de ce parasite, en présence d'oligos complémentaires du mini-exon conduit à l'inhibition de la synthèse de toutes les protéines [4, 18]. L'amplitude de l'effet dépend : *i*) de la taille de l'antisens, *ii*) de sa concentration, *iii*) de la position de la cible sur le mini-exon. Une abolition totale de la synthèse protéique est observée en présence de 3 μ M d'un 35-mère. A la même concentration des oligos plus courts conduisent à une inhibition partielle. De plus, les oligos dirigés contre la partie 5' du mini-exon possèdent une affinité plus faible pour l'ARN (et de ce fait présentent un effet antisens plus faible) que des oligos équivalents dirigés contre d'autres parties du mini-exon. Ceci est attribué à la présence de bases modifiées (en particulier d'adénine en position 6) qui déstabilisent les hybrides (Verspieren et coll., résultats non publiés).

Nous avons également utilisé des oligos liés en 3' au dérivé de l'acridine. Là encore, un 9-mère (Acr) est un meilleur inhibiteur de la traduction *in vitro* qu'un 12-mère non

modifié. Par contre, un 6-mère (Acr) complémentaire du mini-exon ne montre pas d'effet antisens. Nous avons également testé l'effet de ces oligos sur des procycliques : la culture des parasites dans un milieu contenant 100 μ M du 9-mère (Acr) complémentaire conduit à la mort des cellules [17]. Cet effet n'est observé ni avec l'oligo homologue non modifié, ni avec des oligos (Acr) non complémentaires du mini-exon. Le 6-mère (Acr) inactif *in vitro* est également inefficace sur les parasites en culture. Ces résultats suggèrent donc que l'effet trypanocide est lié à l'interaction de l'oligo avec la séquence mini-exon. L'acridine intervient à trois niveaux. Outre son rôle de stabilisation des hybrides oligos/ARN, elle protège également l'oligo antisens de l'action des exonucléases 3' et facilite sa pénétration dans les cellules.

Nous avons testé des oligos antisens portant d'autres modifications : dérivés méthylphosphonates, phosphorothioates, analogues α , oligos couplés à une chaîne polylysine (Il a été montré que la conjugaison à ce polycation facilite la pénétration dans les fibroblastes en culture et conduit à un effet inhibiteur du virus de la stomatite vésiculaire à des concentrations de l'ordre de 100 nM [8]). Aucun des oligos testés à ce jour ne possède un effet trypanocide spécifique en culture (Verspieren et coll., résultats non publiés).

PERSPECTIVES

Autres modifications. Les oligos antisens peuvent être couplés à des dérivés actifs qui induiront des lésions permanentes (coupures, pontages) dans l'ARN cible (*fig. 2*). Il doit en résulter une efficacité accrue. C'est effectivement ce qui a été observé avec des oligos méthylphosphonates liés à un dérivé psoralène dirigés contre un pré-ARNm

du virus de l'herpès [7]. Nous avons utilisé des oligos liés à un agent alkylant qui induit des pontages sur la position N(7) des guanines. Des pontages spécifiques ont été effectivement observés *in vitro* sur l'ARNm de la β -globine de lapin et sur le précurseur du mini-exon (medRNA) de *T. brucei* (Boiziau et coll., résultats non publiés). Dans le premier cas les oligos ainsi modifiés se sont révélés meilleurs inhibiteurs de la traduction dans les systèmes acellulaires que les oligos parents (sans groupe alkylant).

Autres cibles. La traduction n'est pas la seule étape à laquelle des oligonucléotides peuvent interférer avec l'expression des gènes. La maturation des messagers a également été bloquée par des oligonucléotides dirigés contre les sites d'épissage [7]. Le développement de séquences capables de former des triples hélices avec l'ADN en double brin permet d'envisager la régulation de la transcription [14].

CONCLUSION

La stratégie antisens présente un immense intérêt du point de vue technologique et peut-être thérapeutique. Cependant bien des problèmes restent à résoudre qui nécessitent à la fois une meilleure connaissance des modes d'action de ces composés et sans doute l'introduction de nouveaux types de modification chimique.

RÉFÉRENCES

1. Cazenave C., Loreau N., Thuong N. T., Toulmé J. J., 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, 4717-4736.
2. Cazenave C., Loreau N., Toulmé J. J., Hélène C. : Antimessenger oligodeoxynucleotides: specific inhibition of rabbit β -globin synthesis in wheat germ extracts and *Xenopus* oocytes. *Biochimie*, 1986, 68, 1063-1069.
3. Cazenave C., Stein C. A., Loreau N., Thuong N. T., Neckers L. M., Subasinghe C., Hélène C., Toulmé J. J. : Comparative inhibition of rabbit globin mRNA translation by modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 1989, 17, 4255-4273.
4. Cornelissen A. W. C. A., Verspieren P., Toulmé J. J., Swinkels B. W., Borst P. : The common 5' terminal sequence on trypanosome mRNAs: a target for anti-messenger oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14, 5605-5614.
5. Green P. J., Pines O., Inouye M. : The role of antisense RNA in gene regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 1986, 55, 569-597.
6. Heywood S. M., Kennedy D. S., Bester A. J. : Separation of specific initiation factors involved in the translation of myosin and myoglobin messenger RNAs and the isolation of a new RNA involved in translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 2428-2431.
7. Kulka M., Smith C. C., Aurelian L., Fischelevich R., Meade K., Miller P., Ts'o P. O. P. : Site specificity of the inhibitory effects of oligo(nucleosidemethylphosphonate)s complementary to the acceptor splice junction of herpes simplex virus type I immediate early mRNA 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6868-6872.
8. 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, 648-652.
9. Miller P. S., Braiterman L. T., Ts'o P. O. P. : Effects of a trinucleotide ethyl phosphotriester, Gmp(Et) Gmp(Et)U on mammalian cells in culture. *Biochemistry*, 1977, 16, 1988-1996.
10. Minshall J., Hunt T. : The use of single-stranded DNA and RNase-H to promote quantitative « hybrid arrest of translation » of mRNA/DNA hybrids in reticulocyte lysate cell-free translations. *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14, 6433-6451.
11. Mizuno T., Chou M. Y., Inouye M. : Regulation of gene expression by a small RNA transcript (micRNA) in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Japan Acad.*, 1983, 59, 335-338.
12. Mori K., Boiziau C., Cazenave C., Matsukura M., Subasinghe C., Cohen J. S., Broder S., Toulmé J. J., Stein C. A. : Phosphoroselenoate oligodeoxynucleotides: synthesis, physicochemical characterization, anti-sense inhibitory properties and anti-HIV activity. *Nucleic Acids Res.*, 1989, 17, 8207-8219.
13. Stephenson M. L., Zamecnik P. C. : Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 285-288.
14. Toulmé J. J., Hélène C. : Antimessenger oligodeoxynucleotides: an alternative to antisense RNA for artificial regulation of gene expression—a review. *Gene*, 1988, 72, 51-58.
15. Toulmé J. J., Krisch H. M., Loreau N., Thuong N. T., Hélène C. : Specific inhibition of mRNA translation by complementary oligonucleotides covalently linked to intercalating agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 1227-1231.
16. Van der Krol A. R., Mol J. N. M., Stuitje A. R. : Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques*, 1988, 6, 958-976.
17. Verspieren P., Cornelissen A. W. C. A., Thuong N. T., Hélène C., Toulmé J. J. : An acridine-linked-oligodeoxynucleotide targeted to the common 5' end of trypanosome mRNAs kills cultured parasites. *Gene*, 1987, 61, 307-315.
18. Walder J. A., Eder P. S., Engman D. M., Brentano S. T., Walder R. Y., Knutson D. S., Dorfman D. M., Donelson J. E. : The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA. *Science*, 1986, 233, 569-571.
19. Zamecnik P. C., Stephenson M. L. : Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 280-284.