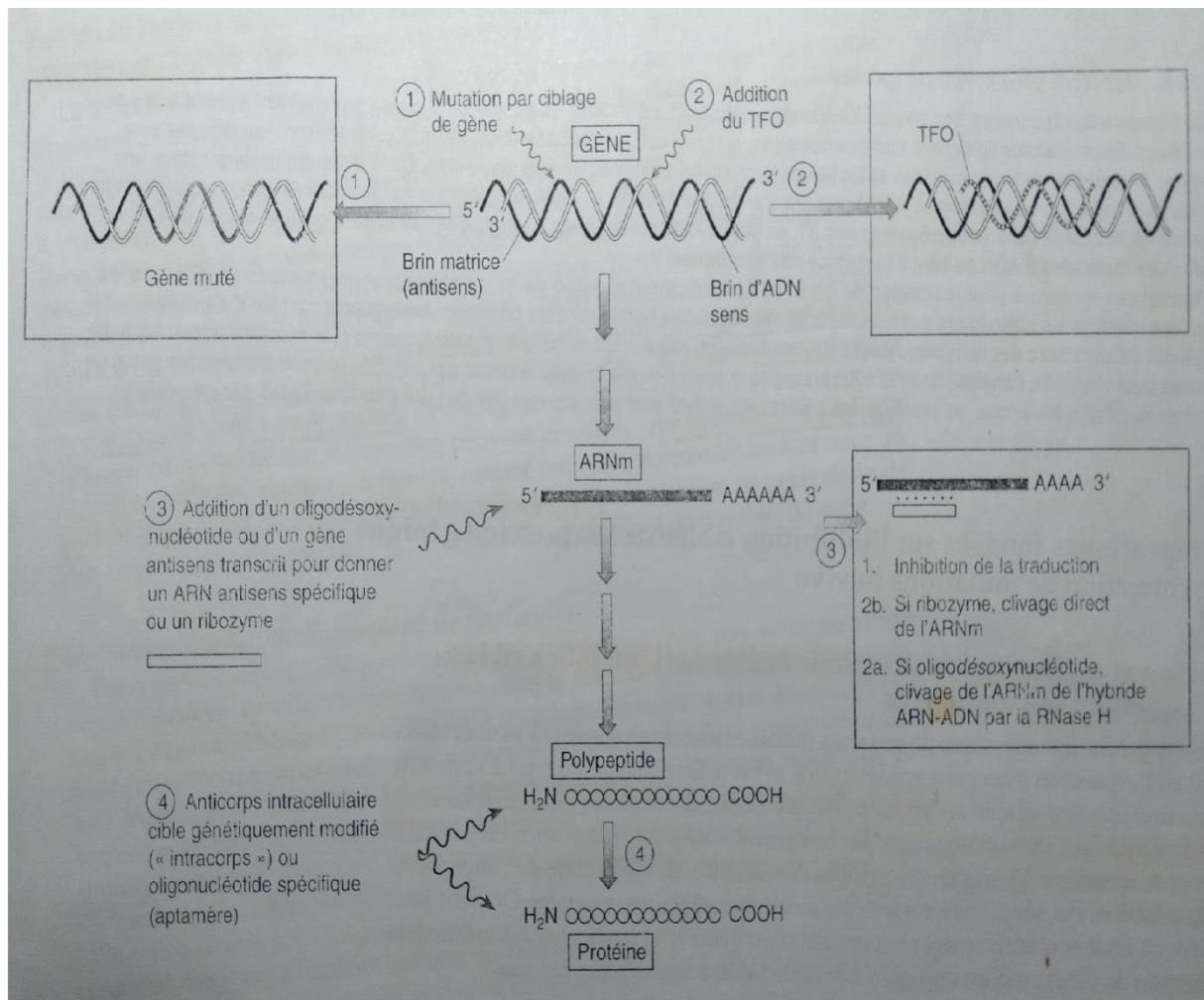


## Pharmacologie génétique

La grande majorité des médicaments actuels ont pour cible les protéines, mis à part certaines exceptions, telles que les anti-tumoraux cytotoxiques formant des adduits sur l'ADN. L'idée de la pharmacologie génétique est de concevoir des molécules qui agissent sur l'expression d'une protéine **en exerçant directement leur effet sur le gène qui contrôle l'expression de cette protéine**. Pour cela, on utilise la chimie de reconnaissance des acides nucléiques, ce qui permet d'envisager, en théorie, une spécificité de séquence absolue liée à l'unicité des séquences génétiques. La thérapie génique fondée sur l'inhibition sélective d'un gène *in vivo* comporte différentes stratégies (Fig 01). Une approche possible repose sur la mutagenèse ciblée d'un gène, conduisant à la production d'une forme non fonctionnelle. Le ciblage de gène par recombinaison homologue offre la possibilité d'inactiver un gène par mutagenèse site-spécifique.



**Figure 01:** Inhibition ciblée de l'expression génique *in vivo*.

## 1. Interaction d'un acide oligodésoxyribonucléique avec une séquence cible.

Dans sa conception la plus naturelle, un acide oligodésoxyribonucléotide (**ODN**) se fixant sur un autre oligonucléotide utilise l'appariement de Watson Crick. Un ODN « antisens » portant une séquence complémentaire permettant la liaison hydrogène Watson-Crick peut avoir plusieurs cibles potentielles sur un ADN ou son transcrit ARN :

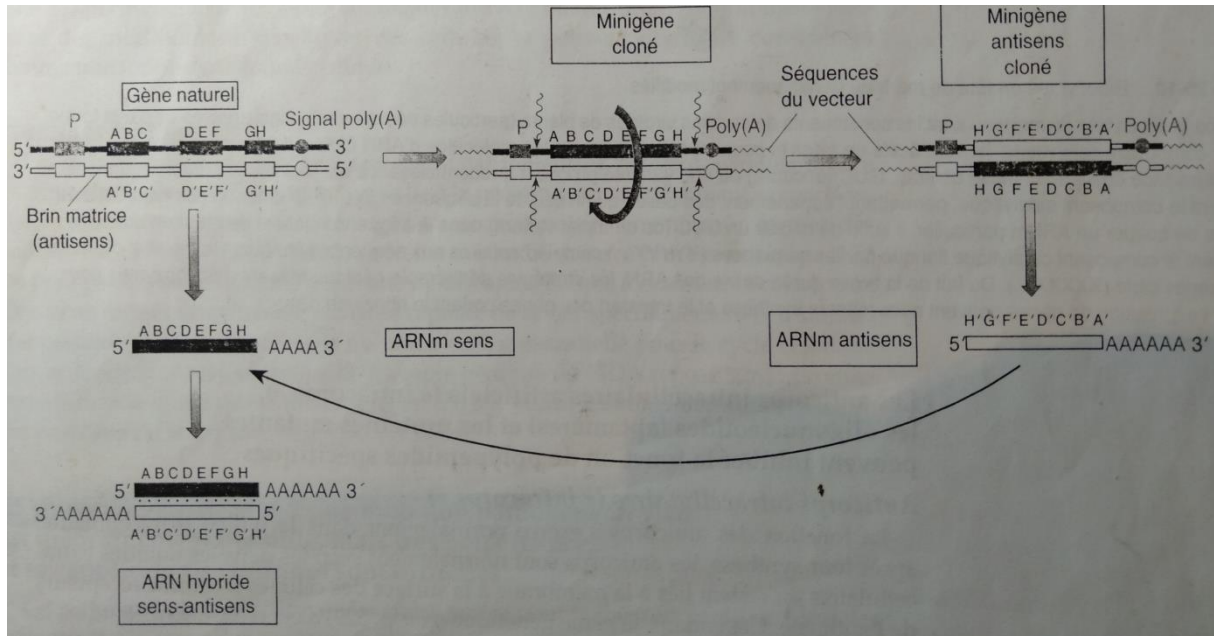
**Cible ADN** : un oligonucléotide antisens peut, en théorie, se fixer sur le brin d'ADN chromosomique dont il est complémentaire. On peut alors espérer bloquer la transcription par les ARN polymérase. L'oligonucléotide antisens peut être ciblé dans la région située immédiatement en amont du site d'initiation de la transcription ou au niveau de la région transcrite. On pourrait par ailleurs, en théorie aussi, obtenir de cette manière le blocage ou le ralentissement de la réplication de l'ADN et obtenir ainsi un effet antiprolifératif. De fait, l'ADN ne représente pas la meilleure cible pour une stratégie antisens, et c'est la fixation sur l'ARN qui conduit aux effets biologiques les plus importants.

Si la cible de l'oligonucléotide est l'**ARN messager**, la stratégie « antisens » vise alors à **bloquer la traduction**. Cet effet peut être obtenu avec un antisens se fixant au niveau de la coiffe de l'ARN messager. Alternativement, des antisens se fixant sur un site d'épissage ont pu **bloquer la maturation** de l'ARN prémessager en ARNm épissé.

L'efficacité biologique d'oligonucléotides antisens à inhiber la traduction est remarquable. Une concentration micromolaire en ODN conduit ainsi, *in vitro* sur cellules en culture, à la disparition quasi-complète de la protéine dont l'ARN est la cible de l'antisens. Des effets ont aussi été décrits *in vivo*, ce qui représente une perspective intéressante pour créer facilement des invalidation temporaires de gène pour des études physiologiques et pharmacologiques.

Comment expliquer cette efficacité des ODN? Pour les ODN synthétiques à liaison internucléosidique phosphodiester ou phosphorothioate, un processus semble être responsable de l'inhibition de la transcription : l'hybridation de l'ODN sur l'ARNm crée localement un hétéroduplexe ADN/ARN. Or, de tels hétéroduplexes sont dégradés dans les cellules par la **RNase H**, enzyme dont c'est justement la fonction cellulaire car de tels hétéroduplexes sont formés et dégradés au niveau de la fourche de réplication. L'ODN est alors libre de se fixer sur un autre ARNm et d'induire sa dégradation. L'oligodésoxyribonucléotide, petite molécule d'ADN, agit donc ici comme un catalyseur régénérable de dégradation des ARNm reconnus par la complémentarité Watson Crick.

Les ODN antisens, même chimiquement modifiés, ne sont pas stables de façon indéfinie. Afin de permettre l'apport continu de la séquence anti-sens, il est une forme de clonage d'expression dans laquelle un gène antisens spécifique peut être cloné dans un vecteur d'expression et transféré dans les cellules cibles (Fig. 2).



**Figure 2 :** Les gènes anti-sens conçus artificiellement peuvent être transcrits en ARNm antisens.

## 2. Oligonucléotides formant triple hélice (Thérapeutique triple hélice)

Des oligonucléotides peuvent être conçus pour se fixer sur une double hélice d'ADN. Une telle approche est nécessaire si l'on veut, par exemple, moduler la transcription d'un gène en se fixant sur son promoteur. La formation d'une triple hélice s'effectue par fixation d'un troisième brin oligodésoxyribonucléotidique dans le grand sillon de l'ADN. Cette fixation est rendue possible par les **liaisons hydrogène de Hoogsteen** présentées dans la figure 3. On voit sur cette figure que seules les bases puriques G et A sont capables de former, en plus d'une liaison de Watson-Crick, des liaisons hydrogène de Hoogsteen. Le second brin d'ADN sur lequel s'hybride le troisième brin doit donc être, en règle générale, formé uniquement de purines. Il y a peu de séquences naturelles homopuriques assez longues sur l'ADN chromosomique pour former des triples hélices stables, ce qui rend cette stratégie assez difficile à mettre en œuvre. Néanmoins, des séquences homopuriques ont été identifiées dans

certains virus, dont le virus HIV, ce qui rend la stratégie triple hélice attractive pour le développement de produits antiviraux à forte sélectivité d'action.

On peut largement raffiner et diversifier les approches triple hélice. Par exemple, certaines équipes ont conçu des « pinces » à ARN ou ADN simple brin. Dans ce système, l'oligonucléotide se fixe en premier lieu en Watson-Crick comme un antisens, puis il se referme sur cette double hélice en formant une triple hélice. De telles pinces ont une forte affinité pour leur cible.

De courts Oligonucléotides (15 à 27 nucléotides) sont capables de se lier spécifiquement à une séquence de l'ADN double brin, formant une triple hélice. L'oligonucléotide se lie par des liaisons hydrogène d'Hoogsteen à l'ADN double brin, sans interrompre les liaisons hydrogènes de Watson-Crick originelles (Fig. 3). Les liposomes sont particulièrement utilisés comme vecteurs dans ce domaine. A l'intérieure des cellules les ODN sont exposés à l'attaque par les exo-nucléases, il est donc habituel de modifier les extrémités 3' e 5' des ODN, afin de les protéger contre l'attaque par les nucléases. Cette modification chimique repose souvent sur l'incorporation des liaisons phosphorothioates contenant du soufre pour produire des S-ODN.

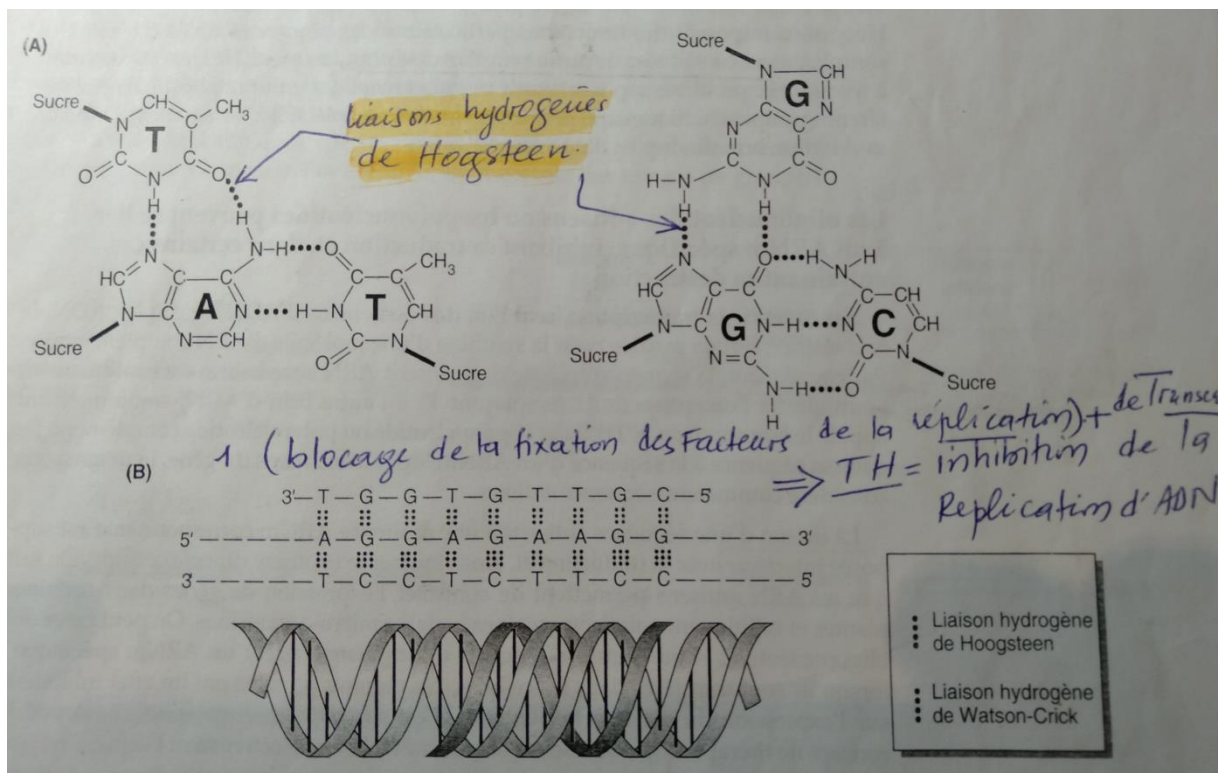


Figure 3: Formation d'une triple hélice au pH physiologique. A : Liaisons hydrogènes de Hoogsteen. B : Formation d'un triplex stable.