



République Algérienne Démocratique Et Populaire.
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abou Bekr BELKAID - Tlemcen



Chapitre X: Thérapie génique par les approches siRNA & shRNA

Dr. Sana TABET-HELAL

Docteur en Biologie Cellulaire & Moléculaire de l'Université d'Evry Val
d'Essonne (France)

Maître de conférences B, Université de Tlemcen

Plan

- I. siRNA présentation
- II. Thérapie génique par approche des siRNAs
 - II.1. Délivrance des siRNAs
- III. shRNAs présentation
- IV. Thérapie génique par approche des shRNAs

siRNA (Small Interfering RNA)

Sont des petits ARN double brin d'environ 21 nucléotides, impliqués dans la dégradation d'une séquence spécifique des ARNm cibles. Ils sont formés de deux brins de 19 nucléotides complètement complémentaires et de deux nucléotides sortant sur chacune des extrémités 3'. Ces petits ARNs sont issus d'ARNdb (double brin) qui peut être d'origine endogène ou exogène ; l'ARNdb exogène peut être virale ou introduit par injection dans l'organisme ou encore transcrit à partir d'un transgène dupliqué avec répétition inverse. Ils sont capables d'inhiber l'expression d'un gène par complémentarité parfaite avec les séquences d'ARNm.

siRNA (Small Interfering RNA)

- Un mécanisme à deux phases a été proposé pour la dégradation des transcrits induite par l'ARNdb. Dans la première phase appelée phase initiatrice, l'ARN double brin est clivé en siRNAs par une ribonucléase de type III appelée Dicer. Au cours de la deuxième phase dite phase effectrice, un brin du siRNA (le brin guide) avec sa région essentielle appelée « Seed Region » (une série de 5 ou 6 nucléotides proche du début de l'extrémité 3') vont guider une machinerie de dégradation appelée RISC (RNA-Induced Silencing Complex) qui va cibler l'ARNm pour le cliver grâce à l'activité endonucléolytique (slicer) de la protéine Argonaute (Meister, 2013).
- Une fois clivé, l'ARNm cible sera dégradé dans les sens 5'-3' et 3'-5' dans des structures cellulaires impliquées dans le stockage et la dégradation des ARN appelées Processing Bodies (P-body) (figure 1) (Eulalio et al., 2007).

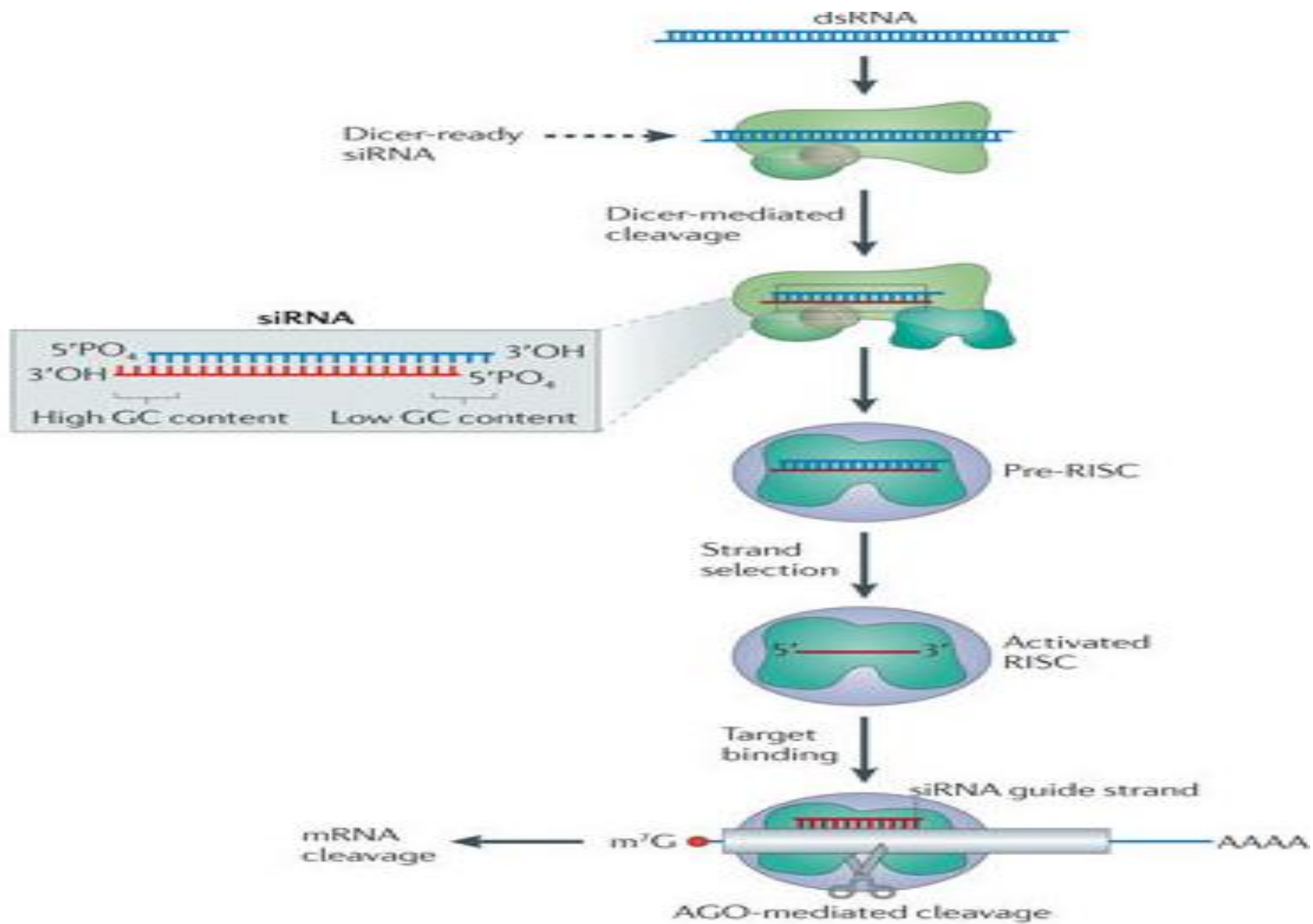


Figure 1 : L'ARN interférent (Davidson and McCray, 2011).

siRNA (Small Interfering RNA)

- Les précurseurs de siARN d'origine endogène ou exogène, comprenant une longue région double brin, sont pris en charge par l'enzyme Dicer qui va les maturer dans le cytoplasme. Les siARN matures sont ensuite pris en charge par le complexe RISC (RNA induced silencing complex) qui va d'abord éliminer l'un des deux brins, le brin passager et garder le brin guide puis avec les autres protéines du complexe RISC, chercher l'ARNm cible pour le dégrader avec l'activité Slicer de la protéine Ago d'une manière séquence spécifique (Davidson and McCray, 2011). Argonaute est une famille de protéines s'associant avec les petits ARN interférents et conférant le silencing de gènes (extinction de gènes), dsRNA: RNA à double brin.

Plan

- II. Thérapie génique par approche des siRNAs

Thérapie génique par l'approche des siRNA

- L'ARNi désigne actuellement l'ensemble des régulations spécifiques de l'expression des gènes qui sont dirigées par une molécule d'ARN de petite taille qui sert de séquence guide. Ces régulations peuvent induire l'arrêt de la transcription du gène ciblé, c'est la voie nucléaire de l'ARNi (Castel and Martienssen, 2013), ou agir au niveau de l'ARNm soit par un mécanisme de dégradation soit par une inhibition de la traduction.
- L'ARNi de par sa spécificité, son adaptabilité, et sa capacité de ciblage, présente un fort potentiel pour la thérapie génique, notamment contre le cancer. Etant donné la difficulté à inhiber certaines cibles avec des petites molécules thérapeutiques, des protéines recombinantes, et des anticorps monoclonaux, l'ARNi est une approche alternative révolutionnaire.

Plan

- II. Thérapie génique par approche des siRNAs
- II.1. Délivrance des siRNAs

Délivrance des siRNAs

- Plusieurs types de modes de délivrance sont apparus. Quel que soit le mode, l'ARN doit se trouver sous forme de molécules d'ARNdb de petite ou de grande taille dans la cellule pour permettre l'initiation du mécanisme de la production des siRNAs et la dégradation de l'ARNm cible:
- **a) Soaking, feeding et bathing** : le « soaking » est une méthode d'immersion concerne uniquement *C. elegans*, les larves sont immergés dans une solution concentrée d'ARNdb synthétisés *in vitro* et identique au gène cible. L'effet de l'incubation est ensuite analysé sur la descendance (Maeda et al., 2001).

Délivrance des siRNAs

- **(b) La transfection :**

on appelle transfection le processus de transfert d'acide nucléique exogène dans les cellules eucaryotes en utilisant un agent de transfection ou l'électroporation. La transfection par un transfectant concerne la délivrance des siRNAs synthétiques et les constructions plasmidiques contenant un Small Hairpin RNA (shRNA).

- Un shRNA est une duplication en tandem avec répétition inverse de 50 à 70 nucléotides dont la transcription conduit à la production d'un ARN pseudo double brin sous forme d'épingle à cheveux qui sera clivé par Dicer en siRNA.

Délivrance des siRNAs

- L'agent de transfection sert à enrober l'ADN ou l'ARN dans des nanoparticules (Vorobyeva et al., 2015) qui protégeront et faciliteront leur passage à travers les membranes cellulaires.
- L'électroporation, concerne uniquement les constructions plasmidiques, il s'agit de l'application de fortes impulsions électriques qui augmentent la perméabilité membranaire et permettent de faire pénétrer le plasmide à l'intérieur de la cellule (Potter and Heller, 2003) (figure 2).

I) L'électroporation expose une cellule à un champ électrique de forte intensité qui déstabilise temporairement la membrane,

II) Cette fois-ci la membrane est perméable à la molécule exogène dans le milieu environnant

III) L'ADN se déplace ensuite dans la cellule à travers ces pores

IV) Lorsque le champ est éteint, les pores de la membrane se referment, enfermant l'ADN à l'intérieur

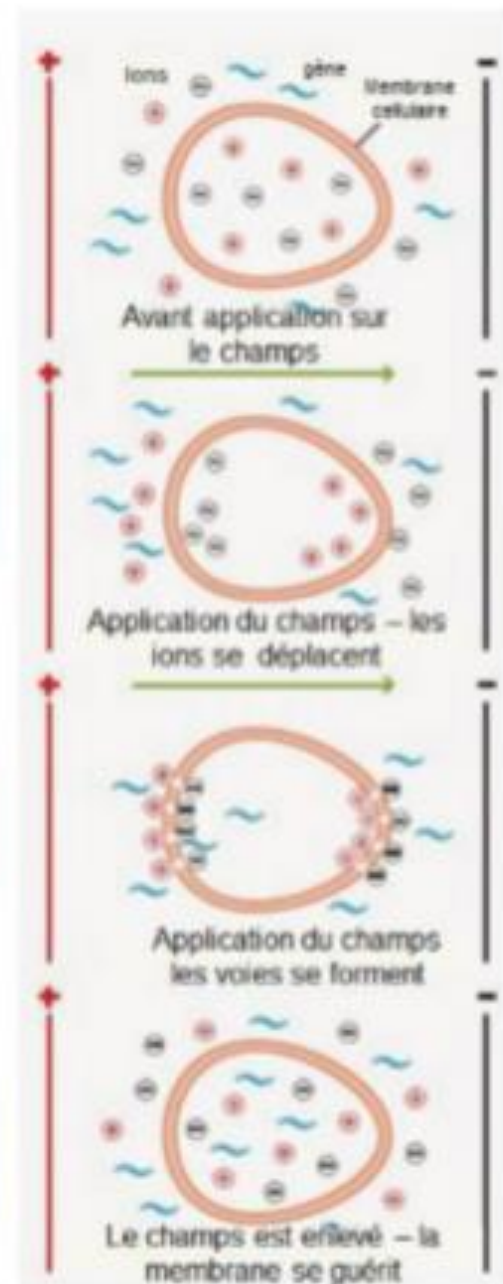


Figure 2: Principe de l'électroporation des cellules.

Délivrance des siRNAs

- **(c) La transduction** : la transduction est un processus du transfert d'ADN entre deux cellules via des particules virales. C'est particulièrement les rétrovirus et les lentivirus qui sont utilisés pour délivrer des shRNAs dans les cellules eucaryotes ou dans un organisme entier comme la souris (Barton and Medzhitov, 2002).
- **(d) L'injection** : c'est une méthode qui s'utilise particulièrement chez *C.elegans*, la drosophile ou la souris. Selon cette méthode, l'ARNdb synthétisé invitro est injecté au niveau de l'intestin (semble être le plus efficace) des jeunes vers hermaphrodites (Fire et al., 1998).
- La diffusion de l'ARNdb injecté dans la plupart des cellules du ver, y compris la lignée germinale, permet la transmission de l'ARNdb à la descendance sur laquelle le phénotype de l'inactivation est détecté et étudié (Grishok et al., 2005).

Plan

- III. shRNAs présentation

Présentation des shRNA (Short Harpin RNA)

Un type d'ARN artificiel, ARN court appelé d'épingle à cheveux (**shARN**), contient une spire serrée d'épingle à cheveux et est fréquemment employé pour amortir des gènes dans une interférence appelée de processus d'shARN. Ils peuvent être utilisé pour réduire l'expression d'un gène cible via phénomène d'interférence par ARN (Bartel, 2004).

Ces RNAs sont introduits dans la cellule par l'intégration et la mise en place d'ADN dans les vecteurs ou plasmides bactériens/viraux.

Présentation des shRNA

- Les shRNAs forment les structures qui ressemblent à une épingle à cheveux et se composent d'une boucle des nucléotides impairs qui sont branchés à une région cheminée de sens et de brins antisens qui sont appariés. Le shARN est le plus souvent transcrit dans le noyau par la polymérase II ou III. Imitant le pré-microARN, il est ensuite transformé en pré-shARN par Drosha, le pré-shARN est exporté du noyau par Exportine 5. Dans un composé avec TRBP et Ago2, Dicer coupe alors shARN en siRNA duplex du nucléotide 19-23.
- Cette boucle est alors combinée dans la spécificité active d'interférence ARN complexe (RISC) et employée comme guide pour viser l'ARNm d'une façon très spécifique. Si la séquence complémentaire est parfaite, le complexe d'extinction clive l'ARNm. Si la séquence est imparfaite, la traduction est réprimée. Le mécanisme d'extinction peut être différent, mais le résultat est le même (figures 3 & 4).

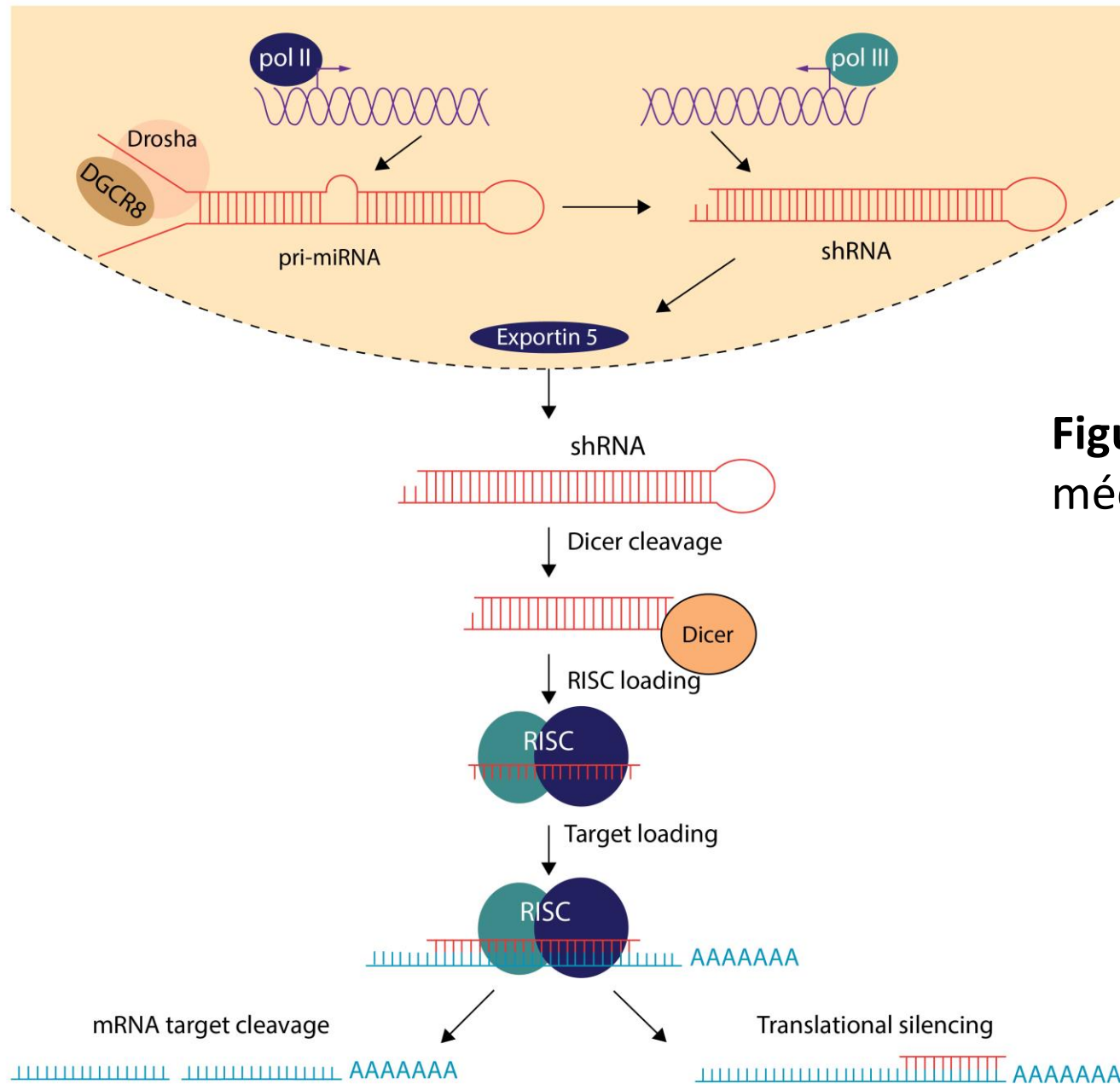


Figure 3: Représentation simplifiée des mécanismes d'activation et rôle du shRNA.

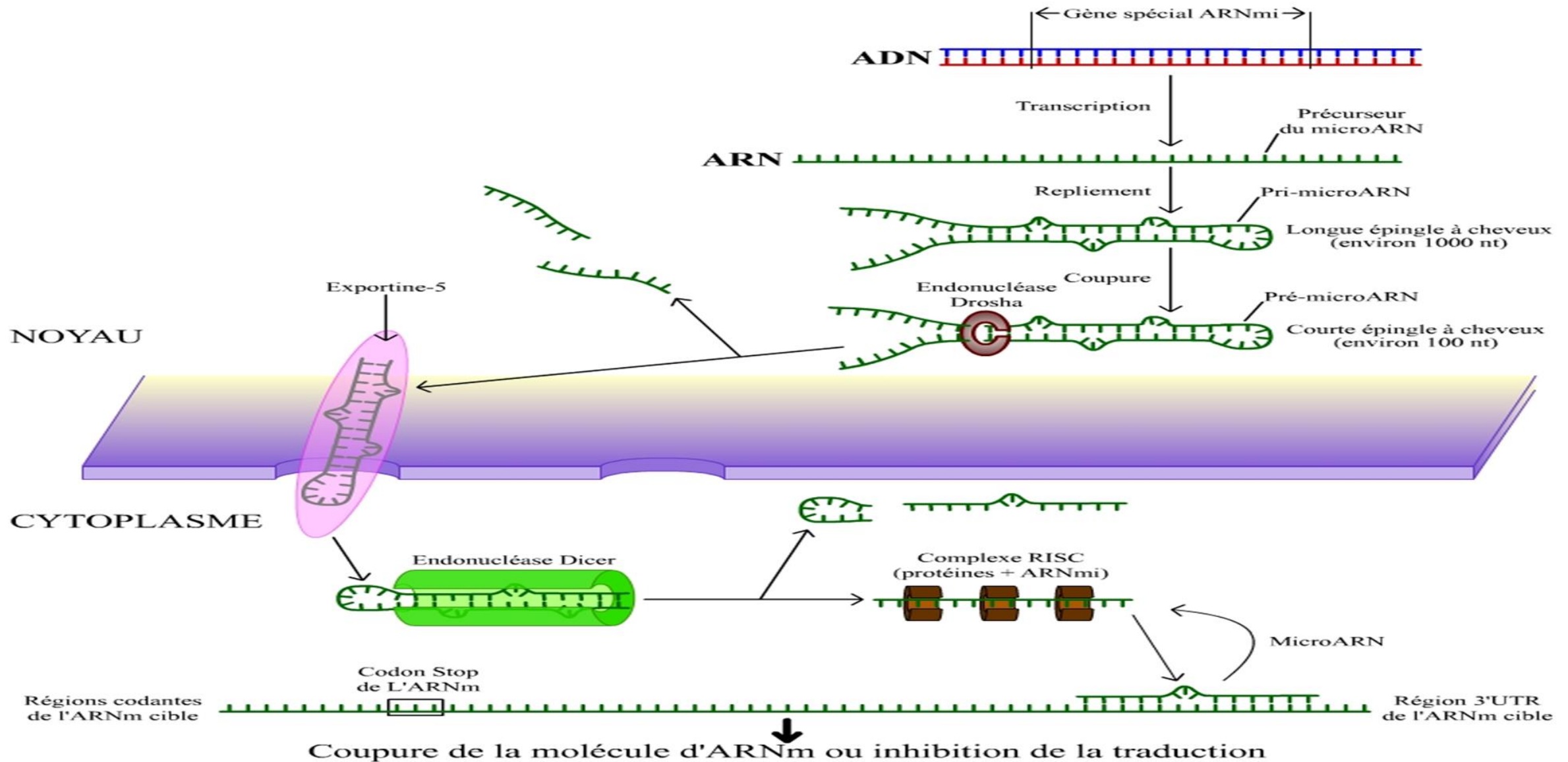


Figure 4: Représentation détaillée des mécanismes d'activation et rôle du shRNA.

Plan

- IV. Thérapie génique par approche des shRNAs

Thérapie génique par l'approche des shRNA

- Une des applications principales de l'interférence d'ARNsh est actuel à l'étude l'amortissement des gènes maladie-associés. Par exemple, les études ont vérifié les utilisations potentielles de cette analyse pour le cancer métastatique, et d'autres cancers avancés. Cependant, ces études ont tous les problèmes difficiles considérés, tels que des méthodes de la distribution.
- Des plasmides peuvent seulement être employés *in vitro*, qui limite leur potentiel d'application. Beaucoup de différents types de vecteurs viraux ont été employés dans des études précédentes, telles que les virus, les lentiviruses, et les adénovirus adeno-associés. Cependant, plusieurs problèmes ont été récent montrés dans les tests cliniques, tels que le développement du cancer dû à la fausse mise en place de plasmide.

Thérapie génique par l'approche des shRNA

- Ce procédé comporte l'inhibition des gènes par la désignation d'objectifs des molécules d'ARNm. L'ARNm est décomposé, évitant la formation de transcription et de protéine. Ceci est effectué par l'introduction de l'ARN bicaténaire dans la cellule, qui est fendue et alors liée par le composé de amortissement ARN-induit (RISC), qui dégrade éventuellement l'ARNm d'une façon de séquence-détail, utilisant petit ARN de intervention (siRNA) comme guide (figure 5).

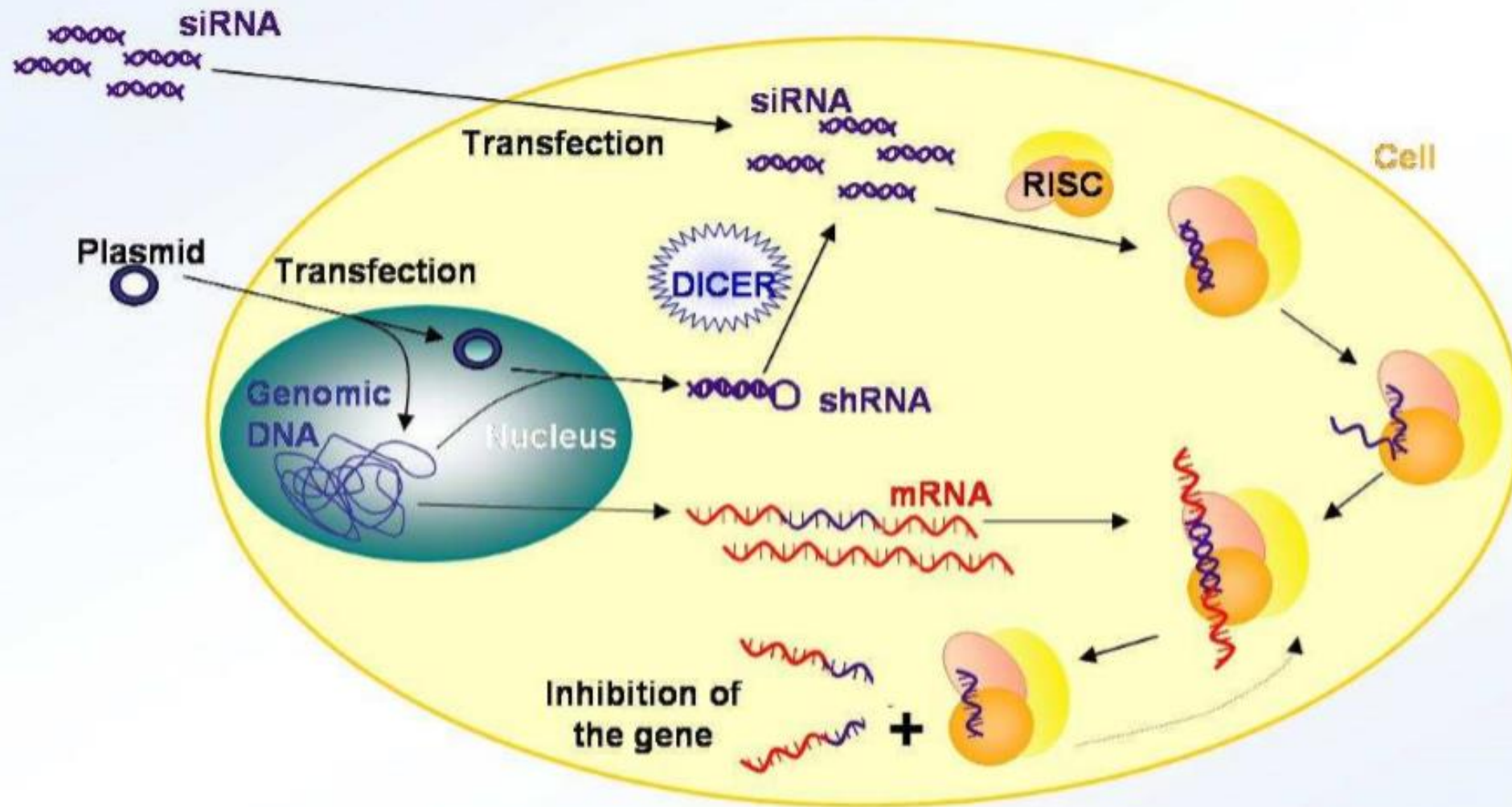


Figure 5: Utilisation du mécanisme d'interférence pour l'inhibition artificielle de gènes d'intérêts. Il est possible de transférer au sein des cellules de petits ARN double-brins (siRNA) ou de faire produire par la cellule après transfection plasmidique ou virale des petits ARN en tige-boucle (shRNA). Les shRNA sont coupés en ARN double-brins par la protéine Dicer puis pris en charge, comme les siRNA exogènes, par le complexe RISC pour entraîner une dégradation spécifique d'un ARN messager.

Conclusion

- La découverte du rôle inhibiteur de l'expression génique des ARN double brin a fourni une approche expérimentale qui répond presque complètement à cette attente. En effet, pour diminuer l'expression d'un gène, il suffit d'introduire dans les cellules de petits ARN double brin qui ont la même séquence que le messenger correspondant et interfèrent ainsi avec l'ARN. Il apparaît de plus que ce mécanisme d'interférence par l'ARN est un élément important des régulations de l'expression génique chez les mammifères, du moins sous une forme spécifique (Dautry and Ribert, 2004).

Références bibliographiques

- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116,281-97.
- Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2002). Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14943-14945.
- Castel, S.E., and Martienssen, R.A. (2013). RNA interference (RNAi) in the Nucleus: roles for small RNA in transcription, epigenetics and beyond. *Nature reviews Genetics* 14, 100-112.
- Dautry, F., and Ribet, C. (2004). RNA interference: towards a functional genomics in mammalian cells? *Medicine Science* 20, 815-9.
- Davidson, B.L., and McCray, P.B. (2011). Current prospects for RNA interference based therapies. *Nature reviews Genetics* 12, 329-340.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. (2007). P bodies: at the crossroads of posttranscriptional pathways. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 9-22.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Références bibliographiques

- Grishok, A., Sinskey, J.L., and Sharp, P.A. (2005). Transcriptional silencing of a transgene by RNAi in the soma of *C. elegans*. *Genes & development* 19, 683-696.
- Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M., and Sugimoto, A. (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current biology : CB* 11, 171-176.
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature reviews Genetics* 14, 447-459.
- Potter, H., and Heller, R. (2003). Transfection by Electroporation. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M Ausubel [et al] CHAPTER, Unit-9.3.
- Vorobyeva, M., Timoshenko, V., Vorobjev, P., and Venyaminova, A. (2015). Aptamers Against Immunologic Targets: Diagnostic and Therapeutic Prospects. *Nucleic Acid Therapeutics* 26, 52-65.