

siRNA ET microRNA : BIOGENESE, MECANISME ET FONCTIONS

MARIANA VARNA¹, VLAD ARTENIE²

Mots clés : siRNA, miRNA, interférence, PTGS

Abstract : L'ARN interférence est un mécanisme hautement conservé entre espèces et permet d'éteindre l'expression d'un gène de manière séquence spécifique en utilisant un ARN double brin. Le rôle naturel du silencing par ARN semble être la régulation fine des gènes mais aussi dans la défense contre les éléments transposables et les virus.

La découverte du mécanisme d'interférence par l'ARN représente un saut majeur dans la recherche des gènes cibles dans différentes maladies.

Deux classes des petites molécules d'ARN ont été trouvées comme étant des régulateurs séquence spécifique post-transcriptionnelle : les siRNA et les microRNA (miRNA). Les siRNA sont produits à partir d'un double brin d'ARN qui est synthétisé *in vitro* ou *in vivo* à partir des virus ou des séquences répétitives introduites par ingénierie génétique. Plusieurs miRNA endogènes sont programmés pour la régulation de l'expression des gènes et ainsi participent à la croissance et le développement de l'organisme. Les miRNA sont des importantes molécules régulatrices dans les plantes et les animaux.

HISTORIQUE

Le phénomène d'ARN interférence a été découvert par Rochard Jorgensen des les années 1990 lors de ses recherches sur les mécanismes de coloration de *Petunias*. Les auteurs souhaitant obtenir un renforcement de la coloration des fleurs ont introduit une deuxième copie du gène de la pigmentation dans le génome de la plante, et ont obtenus contre toute attente, une extinction de la coloration (Napoli *et al.*, 1990). Ces expériences appelées de co-suppression ont mis en évidence un mécanisme très répandu chez les plantes : la protection du génome contre les éléments transposables mobiles et les virus à ARN (Vaucheret and Fagard, 2001). Ce mécanisme a été appelé « *Post Transcriptional Gene Silencing* » ou PTGS.

Plus tard Fire *et al* découvrent que l'introduction d'un ARN double brin (ARN_{db}) dans les cellules de *C. elegans* pouvait réduire spécifiquement l'expression des protéines en se liant à leur ARN messager (ARNm) et ceci pendant plusieurs générations de vers. Cela a permis de comprendre la fonction des nombreuses protéines (Fire *et al.*, 1998). Chez les animaux, ce phénomène a été appelé ARN interférence ou siRNA pour « short interference RNA ». Depuis, d'autres études ont été faites pour mettre en évidence ce mécanisme dans d'autres espèces : chez les insectes (Kennerdell and Carthew, 1998), chez la grenouille (Oelgeschlager *et al.*, 2000), chez la souris (Svoboda *et al.*, 2000). Le phénomène d'ARN interférence est très ressemblant au phénomène de PTGS observé chez les plantes.

CATEGORIES DE PETITS ARN AVEC UN ROLE DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES

- les **siRNA** (short interfering RNAs) représentent des petites molécules d'ARN double brin de 21-22 nucléotides générées à partir d'un long double brin d'ARN.
- les **miRNA** (microRNA) représentent une classe d'ARN simple brin de 19-25 nucléotides, codés par le génome de la plupart des organismes multicellulaires. Certains sont conservés point de vue évolutif et sont régulés pendant le développement. Ils participent à la régulation des certains gènes pendant la synthèse protéique.
- les **tncRNAs** (tiny non-coding RNAs) représentent une nouvelle classe découverte dans le génome de *C. elegans* mais qui n'est pas conservée d'un point de vue évolutif. Leur fonction reste encore inconnue, mais il semblerait qu'ils ciblent le l'ARNm pour la dégradation.
- les **smRNA** (small modulatory RNA), découverts en 2004 chez la souris, pourraient participer à la régulation de l'expression des gènes spécifiques dans les neurones (Novina and Sharp, 2004).

MECANISMES D'INTERFERENCE PAR LES siRNA

L'ARN interférence est un terme qui se réfère à un silencing génique post-transcriptionnel induit soit par la dégradation soit par l'arrêt de la traduction de l'ARNm cible (voir (Ryther *et al.*, 2004)). Chez les plantes, l'introduction d'un double brin d'ARN induit la méthylation des séquences génomiques homologues. La fonction naturelle de l'interférence chez les plantes est la protection du génome contre l'invasion par des éléments génétiques mobiles comme les transposons et les virus qui produisent un ARN double brin quand ils deviennent actifs (Jensen *et al.*, 1999; Malinsky *et al.*, 2000).

Jusqu'en 2001, toutes les tentatives pour transposer cet outil très puissant dans les cellules de mammifères s'avéraient négatives. En effet, chez les mammifères, l'introduction d'un long ARN double brin conduisait à la production d'interféron, bloquant ainsi toute synthèse protéique, de façon indépendante de la séquence du siRNA introduit. En mai 2001, l'équipe de Thomas Tuschl a publié ses résultats en montrant que chez les mammifères, ce processus est médié par des petits fragments de 21-22 nucléotides (Elbashir *et al.*, 2001b) correspondant à celle des produits de clivage des grands

ARN double brin observées chez les plantes lors du processus de l'ARN interférence. Ces oligonucleotides ont depuis été appelés siRNA.

Le long ARN double brin pourrait être produit à partir d'un transgène ou d'un virus (figure 1 et figure 2B). Une enzyme appelée Dicer (RNAses de type III) va cliver le long ARN double brin dans des petits molécules de siRNA. Le brin sens (bleu) est dégradé pendant que le brin antisens (jaune) est utilisé pour cibler l'ARNm pour le silencing.

Chez la drosophile et les mammifères, le brin antisens est incorporé directement dans un complexe connu sous le nom de « RNA-induced silencing complex » (RISC), ou « RNA induced initiation of transcriptionnal silencing complex » (RIST), ou miRNP, pour cibler la séquence complémentaire de l'ARNm et pour la détruire. Chez le ver *C. elegans* et les plantes, le brin antisens lie une enzyme appelée RdRP (RNA-dependent RNA polymerase) qui va s'apparier à un ARNm qui lui servira comme point de départ pour la synthèse d'un ARN complémentaire. L'enzyme Dicer est nécessaire pour générer des nouveaux siRNA spécifiques pour le même ARNm. Finalement la cible est détruite (Novina and Sharp, 2004).

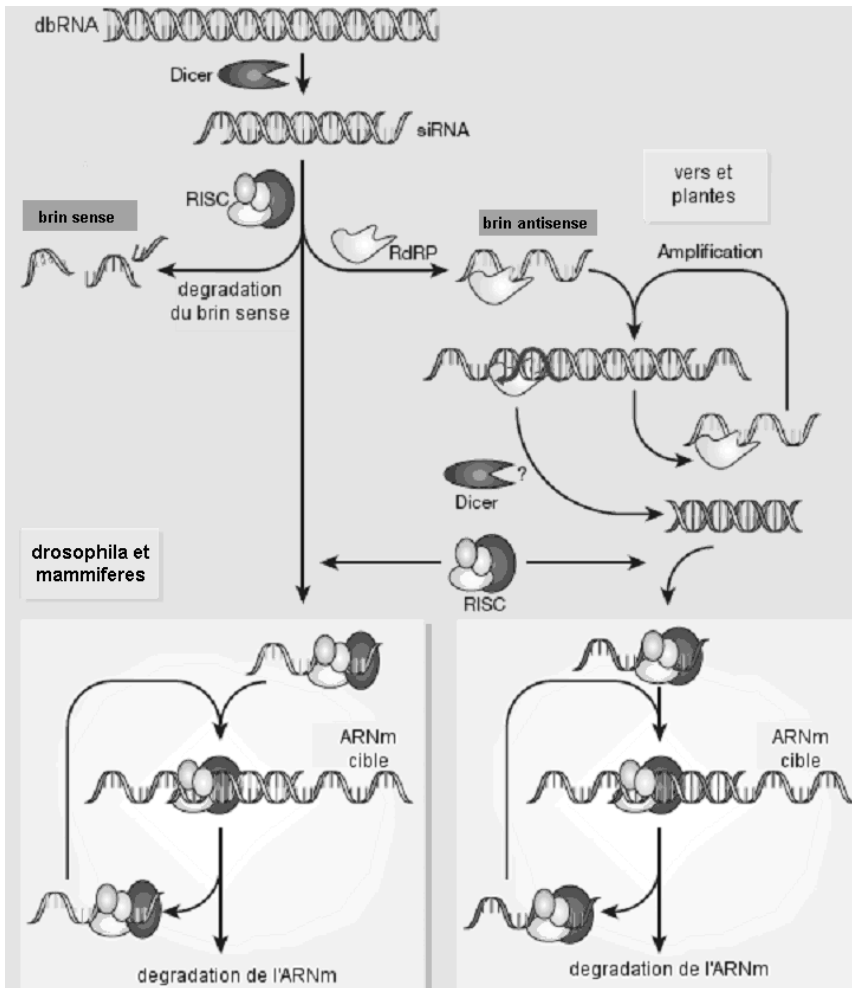


Figure 1 : Mécanismes d'action des siRNA (d'après Novina CD, 2002)

Quand la petite molécule de siRNA se lie à sa cible, la complémentarité de séquence peut varier. Elle peut être à peu près parfaite et dans ce cas l'ARNm cible est clivé entre les nucléotides 10 et 11 dans la partie 5' terminale du siRNA. Dans le cas où la complémentarité est très basse le résultat de l'interaction entre le siRNA et la cible est la répression transcriptionnelle. Pour l'inhibition de la translation, il peut y avoir plusieurs sites reconnus sur l'ARNm (Kim, 2005).

Les siRNA peuvent être divisées en deux classes : symétriques et asymétriques. Les siRNA symétriques ont les deux parties terminales stables et identiques, et c'est pourquoi les deux brins vont être assemblés dans un complexe RISC avec la même efficacité (revu dans Tang, 2005)). Par contre, un siRNA asymétrique a une partie terminale qui est moins stable que l'autre. De manière surprenante, la plupart des miRNA sont très asymétriques ce que mène à un assemblage asymétrique dans le complexe RISC dans les cellules (Schwarz *et al.*, 2003).

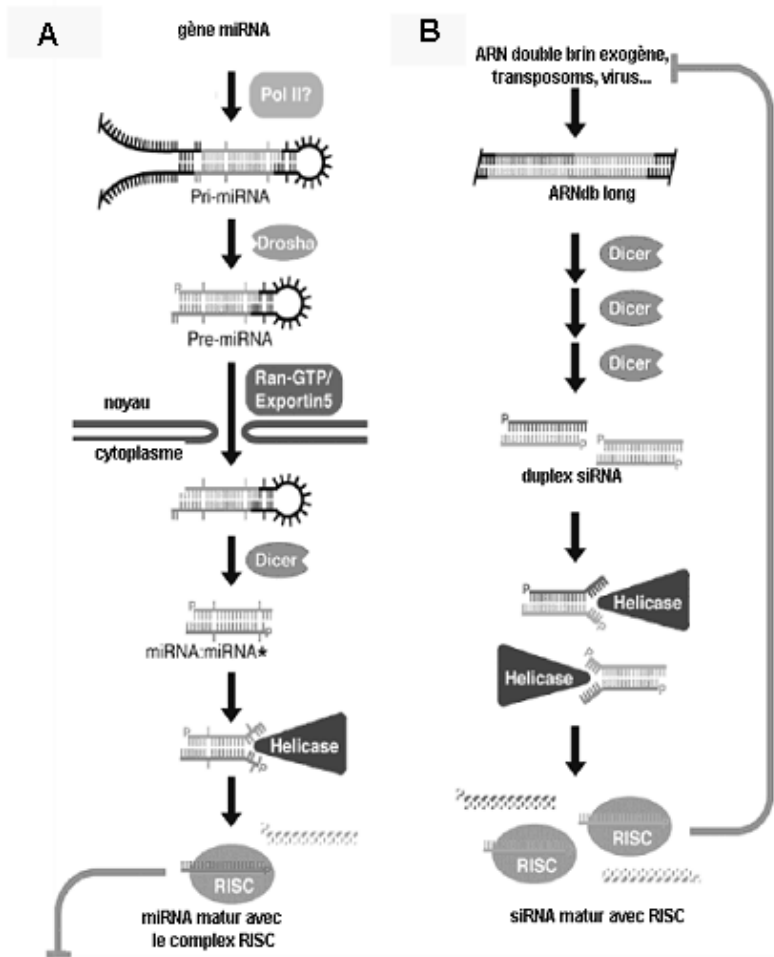
MECANISME D'INTERFERENCE PAR LES microRNA

Des recherches ont mis en évidence chez plusieurs espèces animales une catégorie des ARN courts (19-25 nucléotides) appelés microRNA (miRNA). Les miRNAs sont abondants dans la cellule variant de quelques centaines jusqu'à 40000 (revue dans Novina and Sharp, 2004). Ils sont codés par le génome mais ne produisent pas des protéines. Par contre, ils participent à la régulation de l'expression des ARNm. Les miRNAs représentent à peu près 0.5-1% du génome humain.

En ce que concerne leurs biogenèse (figure 2A), les microRNA sont formés à partir d'un ARN en épingle à cheveux et ont par conséquence dans leurs biogenèse une étape où ils sont en double brin. Tout comme les siRNAs, les miRNAs sont produits à partir des ARN double brin après le clivage par l'enzyme Dicer.

Dans les deux cas, il s'agit d'un ARN en épingle à cheveux appelé « primary micro-RNA » ou *pri-miRNA*. L'enzyme nucléaire Drosha va cliver les *pri-miRNA* en petites molécules double brin de 70 nucléotides appelés précurseurs *pre-miRNA*. Une autre enzyme, Dicer, va former un grand complexe appelé « microprocessor complex » de 500-650 kDa, avec les cofacteurs DGCR8/Pasha (Schwarz *et al.*, 2003). Ce complexe est exporté du noyau vers le cytoplasme par l'exportine 5 (Exp5) où une autre enzyme va les cliver pour former des miRNA matures simple brin de 21-22 nucléotides. Un miRNA mature est clivé dans un complexe ribonucleoprotéique (miRNP) qui va lier la partie 3' non traduite de l'ARN messenger cible en empêchant ainsi sa transcription (Bernstein *et al.*, 2001).

Il y a deux enzymes RNases de type III essentielles dans ce système : Dicer et Drosha. Elles sont des grandes protéines avec des domaines catalytiques en tandem et un domaine de liaison à l'ARN dans sa partie C-terminale. Dicer est une protéine très conservée et on peut trouver des homologues des DICER chez la levure (Dcr), une chez l'homme (Dicer), une chez *C.elegans* (DCR-1), deux chez la Drosophile (DCR1 et DCR2) et quatre chez Arabidopsis (DCL1, DCL2, DCL3, DCL4) (Kim, 2005).



ARNm du gène

Figure 2 : Les différences entre les mécanismes d'action des miRNA et des siRNA

De l'autre côté Drosha est une enzyme RNAase de type III nucléaire, qui a été découverte pour la première fois chez l'homme ensuite chez la Drosophile et *C. elegans*. Drosha initie la maturation des miRNA. Il y a un seul homologue de Drosha dans chaque espèce avec le rôle d'initier la maturation des miRNA.

Il existe d'autres protéines ayant un rôle important comme par exemple les protéines Argonautes (Ago) qui jouent un rôle central dans différents aspects de la voie siRNA directement en interagissant avec les petits ARN pour former un complexe effecteur appelé RISC. Les protéines de la famille Argonaute sont des protéines très basiques faisant approximativement 100 kDa, qui contiennent deux domaines appelées PAZ et PIWI. Contrairement à la voie siRNA, la voie miRNA est initiée dans le noyau (Lee *et al.*, 2003).

ROLE DES microRNA

Contrairement aux siRNA qui ciblent les gènes ou les éléments génétiques qui les a formé, les miRNAs régulent des gènes séparés. En mode normal, un ARNm peut contenir plusieurs sites de liaisons des différents miRNAs dans sa partie 3' non transcrite.

Leur rôle est divers : dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et le métabolisme chez les insectes, dans le développement neuronal chez les nématodes, dans le contrôle du développement des feuilles et fleurs chez les plantes, et dans la différenciation des lignées hématopoïétiques chez l'homme (table 1) (Bartel, 2004).

Parmi quelques exemples de miRNA, on peut citer lin-4 et let-7 chez *C. elegans* ayant un rôle dans le développement précoce. Un autre miRNA chez la drosophile, appelé *bantem* RNA, participe dans la suppression de l'apoptose, stimule la prolifération cellulaire. Chez les mammifères, il y a mir-181 impliqué dans le contrôle de l'hématopoïèse, et d'autres exemples chez l'homme qui seront repris dans un paragraphe consacré plus loin. Chez la souris, miR-196 inhibe l'expression des gènes homeobox HOXB8 impliqué dans la régulation du développement (Yekta *et al.*, 2004).

Les miRNA chez les plantes disposent d'un grand degré de complémentarité avec la cible de l'ARNm ce qui induit le clivage (Llave *et al.*, 2002). La plupart des cibles des miRNA chez les plantes semblent être des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du développement et la différenciation cellulaire. Dans les plantes, des miRNA matures sont détectés dans la fraction nucléaire et cytosolique (Lingel *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005). La plupart des miRNA animaux ou végétaux résident entre les gènes qui codent pour les protéines ou dans les introns (revu dans (Brodersen and Voinnet, 2006)).

Les cibles des miRNA chez les animaux sont beaucoup plus diverses que chez les plantes.

Tableau 1 : Exemple des microRNAs chez différentes espèces. Selon Bartel *et al.*, 2004 avec modifications

Espèce	Nom du miRNA	Rôle	Références
Nématodes <i>C. elegans</i>	Lin-4	développement larvaire précoce	(Lee <i>et al.</i> , 1993)
	Let-7	développement larvaire précoce	(Reinhart <i>et al.</i> , 2000)
	Isy-6	asymétrie gauche/droite de l'expression des chémorécepteurs	(Reinhart <i>et al.</i> , 2000)
Insectes	miR-14	apoptose et métabolisme	(Xu <i>et al.</i> , 2003)
	miR-7	développement neuronal médié par la voie Notch	(Wightman <i>et al.</i> , 1993)
mammifères	miR-181	différenciation hématopoïétique	(Zhan <i>et al.</i> , 2007)
	miR-451	différenciation érythroïde	(Zhan <i>et al.</i> , 2007)
	miR-23a	croissance et localisation des cellules progénitrices hématopoïétiques	(Lewis <i>et al.</i> , 2003)
	miR-101	prolifération des cellules hématopoïétiques; différenciation cellulaire	(Lewis <i>et al.</i> , 2003)
	miR-302; miR-124	différenciation neuronale	(Hohjoh and Fukushima, 2007)
	miR-1	facteur de croissance; développement neuronal	(Lewis <i>et al.</i> , 2003)
	miR-29	régulation de l'apoptose	(Mott <i>et al.</i> , 2007)
plantes	miR-159	développement des feuilles	(Palatnik <i>et al.</i> , 2003)
	miR-165/166	initiation du méristème axial et le développement des feuilles	(Tang, 2005) (Emery <i>et al.</i> , 2003)
	miR-172	développement des fleurs	(Park <i>et al.</i> , 2002b); (Aukerman and Sakai, 2003)

LES miRNA CHEZ L'HOMME

Même si un lien exact entre les petites molécules d'ARN et les maladies humaines n'a pas été totalement établi, quelques miRNA semblent être impliqués dans la tumorigenèse (Calin *et al.*, 2002; Metzler *et al.*, 2004).

Certains miRNA résident dans les introns et semblent être des éléments régulateurs pour les ARNm des gènes hottes pendant que d'autres miRNA semblent être transcrits à partir de leur propre promoteur. Cependant aucun transcrit primaire n'a pas été trouvé (Lee *et al.*, 2003).

Les microRNAs sont donc impliqués dans la régulation de l'expression des gènes en inhibant la traduction des ARN messagers en protéines. Des études ont montré que certains miRNAs seraient impliqués dans la différenciation érythroïde chez l'homme et chez la souris. En effet en utilisant une méthode basée sur le profil d'expression des 295 miRNA avant

et après l'induction de la différenciation érythroïde, les auteurs trouvent une sur expression de miR-451 (Zhan *et al.*, 2007). D'autres microRNA comme le miR-29 sont impliqués dans la régulation de l'apoptose (Mott *et al.*, 2007), pendant que d'autres comme miR-34 et miR-34-C seraient des cibles de p53 pour coopérer dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de la croissance (Corney *et al.*, 2007). Dans le même sens, dans une autre étude comparant le profil d'expression des miRNA entre les cellules p53 WT (wild type) et p53 déficientes, les auteurs trouvent que les miR34a-c seraient les cibles transcriptionnelles directes de p53 *in vivo* et *in vitro*. Les miR-34 pourrait inhiber une prolifération cellulaire anormale (Corney *et al.*, 2007).

Parce que les miRNA sont des molécules régulatrices endogènes leur altération dans l'expression pourrait contribuer à une croissance anormale due à une modulation dans l'expression des certains gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la survie. En effet il a été trouvé que plusieurs miRNA (Mir-21, miR-141, miR-200b) seraient exprimés dans la cholangiocytose maligne. L'inhibition de miR-21 et miR-200b augmente la sensibilité au traitement par la gemcytabine, pendant que l'inhibition de miR141 induit une diminution de la croissance cellulaire (Meng *et al.*, 2006). D'autres études faites sur miR-21 mettent en évidence un rôle d'oncogène. Dans les cancers du sein, il serait sur-exprimé par rapport au tissu normal et pourrait régler la tumorigénèse en passant par la régulation des gènes comme la BCL-2. Ainsi il pourra servir comme nouvelle cible thérapeutique (Si *et al.*, 2007). Mais miR-21 est impliqué aussi dans les tumeurs hépatocellulaires (HCC) où il est surexprimé avec un effet sur l'augmentation de la croissance cellulaire, migration et invasion (Meng *et al.*, 2007).

En utilisant des nombreuses techniques de biologie moléculaire comme Northon blot, RT-PCR, miRNA- microarray ou la sur- et la sous-expression des certaines miRNA il a été trouvé que certains miRNA sont directement liés à des cancers humains comme le cancer du poumon, du sein, du cerveau, du colon et certaines leucémies. De plus, certains miRNA agissent comme des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs (rev (Zhang *et al.*, 2007)).

METHODES D'INDUCTION DE L'ARN INTERFERENCE

L'utilisation d'une telle méthode doit tenir compte des plusieurs points : (1) la stabilité du siRNA ; (2) la capacité d'induire une expression constitutive ; (3) la capacité d'une délivrance spécifique d'un tissu ; (4) la possibilité d'avoir la meilleure méthode d'identifier les sites de silencing. Afin de répondre à tous ces points différents variants de siRNA ont été développées.

1. La synthèse chimique des siRNA

La synthèse chimique des oligonucléotides est une méthode utilisée en biologie moléculaire mais la production d'un type spécifique de siRNA nécessite des étapes complémentaires comme la génération des brins homologues, la linéarisation, l'addition des produits chimiques pour augmenter la stabilité et s'assurer que les deux nucléotides libres à la fin des brins sont présents. Malgré la facilité pour générer des siRNA synthétiques un des points essentiels est le choix de la séquence qui doit être ciblée (Ichim *et al.*, 2004). A présent, il est suggéré que la région cible doit être d'au moins à 70-100 nucléotides éloignée du site d'initiation de la traduction et que le contenu en paires AU : GC doit être moins de 50% (Caplen and Mousses, 2003). La première utilisation des siRNA synthétiques a été réalisée dans des lignées cellulaires sur les protéines du cytosquelette : laminin A, C, B1, vimentine (Elbashir *et al.*, 2001a). La suppression spécifique de l'ARNm cible a été vérifiée au niveau de l'ARN mais aussi au niveau de la protéine. Il a été aussi remarqué que la viabilité cellulaire n'était pas affectée.

2. La synthèse enzymatique des siRNA

Un problème de l'utilisation des siRNA synthétiques est que la séquence cible est non prédictible. Un ciblage simultané des plusieurs segments du même transcrite induit à un silencing nettement plus élevée et plus sûr (Ji *et al.*, 2003). Une alternative est de générer des duplex de siRNA pour chaque ARNm cible et de générer par clivage enzymatique des homologues double brin des ARN en utilisant une enzyme provenant d'*Escherichia coli* appelée « RNase de type III » (Katoh *et al.*, 2003).

Pendant que la synthèse chimique des siRNA a l'avantage d'être facile à réaliser cette méthode reste quand même très coûteuse. La possibilité de générer des siRNA par clivage enzymatique est moins coûteuse et permet de réaliser un silencing plus ciblé.

MODALITES D'INTRODUCTION DES siRNA

Les siRNA semblent être des outils très intéressants pour l'étude des fonctions des gènes. Il reste quand même le problème de l'introduction de ces molécules dans un organisme. Chez *C. elegans* l'expérience est très simple : en injectant dans le ver une solution contenant de l'ARN double brin, en trempant les vers dans une solution contenant ces molécules ou en les nourrissant avec des bactéries qui expriment un ARN double brin, le gène cible sera inhibé (Novina and Sharp, 2004). Ceci n'est pas aussi simple chez les organismes évolués. Différentes méthodes d'introduction des siRNA ont été mises au point afin de réaliser un silencing génique *in vivo* et *in vitro*. Le protocole de transfection développé à l'origine est basé sur l'utilisation des lysosomes. Une telle méthode à une efficacité de transfection

d'approximativement 90% mais malheureusement elle est très chère et, de plus assez toxique *in vivo* (Surowiak, 2003). C'est pourquoi d'autres méthodes ont été développées pour introduire un siRNA.

a) Administration directe des siRNA

Une première expérience a été réalisée par l'équipe de McCaffrey, en injectant un volume de sérum physiologique contenant des siRNA dans la veine de la queue chez la souris (McCaffrey *et al.*, 2002). Les auteurs ont réussi à inhiber avec succès l'expression de la GFP (Green Fluorescence Protein) et l'antigène B.

b) Administration des siRNA par des vecteurs viraux

Une transfection stable a été réalisée avec des différents virus. Ainsi une transfection rétrovirale avec des siRNA dirigés contre le gène *TP53* a été réalisée dans des lignées cellulaires et des fibroblastes *in vitro* (Barton and Medzhitov, 2002). Une autre approche c'est l'utilisation des adénovirus (Xia *et al.*, 2002) mais pendant que les rétrovirus et les adénovirus s'incorporent dans les cellules en prolifération, les lentivirus ont l'avantage de s'incorporer avec une grande efficacité dans les cellules qui ne se divisent pas (Abbas-Terki *et al.*, 2002 ; Qin *et al.*, 2003).

APPLICATION DE L'ARN INTERFERENCE

Il est possible d'inactiver fonctionnellement un gène choisi avec une remarquable spécificité et d'évaluer son implication fonctionnelle dans un processus physiopathologique. La connaissance de la séquence d'un ARN permet la synthèse d'un siRNA capable d'induire sa dégradation. Le mécanisme de siRNA ouvre le champ à des applications majeures comme la **recherche des cibles pharmacologiques** ou l'utilisation comme un **nouvel agent thérapeutique**.

ARN INTERFERENCE COMME OUTILS D'ETUDE

En 2006, plus de 14000 articles scientifiques faisaient référence à cette technique d'interférence d'ARN montrant un grand intérêt des chercheurs. L'utilisation des siRNA pour étudier la fonction d'un gène chez les mammifères est devenue en très peu d'années une technique de base utilisée en biologie.

Les fonctions biologiques de la topoisomérase I (TOP1) ont été difficilement étudiés car la délétion de ce gène est létale chez les métazoaires. Des études réalisées avec des siRNA dirigés contre l'ARNm de TOP1, sur des lignées cellulaires ont mis en évidence le fait que TOP1 est aussi impliquée dans le contrôle de la stabilité génétique, la transcription de certains gènes et dans la réponse à différents agents chimiothérapeutiques (Miao *et al.*, 2007).

ARN INTERFERENCE COMME NOUVEL AGENTS THERAPEUTIQUE

Pouvoir développer des médicaments basés sur l'utilisation des siRNA est une nouvelle voie dans l'avenir du médicament. L'une des stratégies la plus courantes est de trouver la cible thérapeutique afin d'inactiver le gène et d'observer le résultat. Si la neutralisation d'un gène particulier permet de soigner un animal malade, la protéine codée par ce gène pourrait être la cible d'un médicament basé sur siRNA.

Les applications des siRNA comme médicament ont été étudiées récemment (Hemann *et al.*, 2003). La promesse thérapeutique de cet outil est basée sur plusieurs conditions : disponibilité, absence de toxicité, spécificité des effets de silencing et efficacité *in vivo* (rev dans Ichim *et al.*, 2004). Cette approche est utilisée dans les essais de traitements des différentes maladies comme les infections virales, les cancers, l'hépatite, des maladies neurodégénératives ou l'angiogenèse oculaire pathologique.

Les siRNA ont été utilisés dans des expériences de traitement des infections virales par VIH ou l'hépatite (Randall *et al.*, 2003). Dans les essais sur VIH, l'entrée du virus dans les cellules cibles a été bloquée et le virus a ainsi été dans l'impossibilité de se répliquer. Une autre équipe a démontré une inhibition efficace des miRNA impliqués dans la réplication de VIH-1 et cette inhibition a été remarquée au niveau du nombre des copies virales qui a été fortement réduit (Lo *et al.*, 2007). Mais les vecteurs lentiviraux sont eux aussi été utilisés dans les essais de lutte contre cette maladie. Les vecteurs lentiviraux ont la capacité de traverser l'enveloppe nucléaire pour arriver dans le noyau dans les cellules qui ne se divisent pas (Li *et al.*, 2003).

Les expériences menées sur le virus de l'hépatite C ont conduit à un silencing du génome viral. Ainsi en utilisant une méthode de PCR des séquences des siRNA il a été possible de tester des séquences candidates anti-HBV qui pourraient être introduites dans un vecteur. Le résultat a été une inhibition à long terme de l'expression des gènes et de la réplication du virus HBV. Ceci pourra être un outils intéressant pour le traitement de cette infection (Ren *et al.*, 2006).

En utilisant des oligonucléotides antisens sur des lignées cellulaires de cancer d'ovaires, il a été obtenue une sous-régulation de la survivine, une molécule anti-apoptotique, sur-exprimée dans des nombreuses tumeurs humaines et qui induit la résistance aux drogues chimiothérapeutiques (Ma *et al.*, 2005).

Jusqu'à présent siRNA a été utilisé contre un certain nombre des oncogènes comme la K-Ras (Kawasaki and Taira, 2003) *TP53* muté (Martinez *et al.*, 2002). *In vivo*, le siRNA a été utilisé dans un modèle murin de souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency) pour inhiber l'oncogène H-Ras (Yang *et al.*, 2003).

Afin d'avoir un silencing des gènes beaucoup plus ciblé à un organe, une équipe a utilisé des nanoparticules qui portent le siRNA contre le gène d'intérêt et en même temps un ligand tissulaire spécifique. L'administration par la voie intraveineuse chez la souris a montré une délivrance tumorale spécifique et une inhibition siRNA séquence spécifique. Ces résultats montrent la réussite sur deux niveaux de ciblage : le premier c'est au niveau du tissu et le deuxième est au niveau du gène (Schiffelers *et al.*, 2004). Plus récemment dans le même sens une autre étude montre l'impacte d'un ciblage tumoral spécifique sur la bio-distribution et l'efficacité des nanoparticules de siRNA mesurée par l'imagerie *in vivo* PET (Positron Emission Tomography) (Bartlett *et al.*, 2007).

L'espoir d'utiliser siRNA dans la clinique est retenu par le problème de délivrance. Même si l'approche virale est très prometteuse, elle ne peut pas être mise en place en clinique. Une autre méthode attirante est l'utilisation des immunoliposomes, qui sont des membranes artificielles avec des anticorps spécifiques attachés à des couches lipidiques. Cette méthode a été utilisée avec succès pour délivrer des agents chimiothérapeutiques en utilisant des anticorps contre la protéine Her-2 (Park *et al.*, 2002a).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A partir de la découverte du phénomène de silencing transcriptionnel en 1990 et jusqu'à présent cette méthode ouvre de plus en plus des champs d'application avec des avancées spectaculaires. L'utilisation de la technique de siRNA est supérieure par rapport à d'autres méthodes de silencing car : 1) le blocage est plus efficace ; 2) le ciblage du gène cible est plus spécifique ; 3) l'effet inhibiteur peut passer par des multiples générations ; 4) la transfection est élevée *in vitro* et d'une manière stable ; 5) des cibles simultanées peuvent être utilisées.

La délivrance ciblée représente une méthode très prometteuse pour une thérapie locale plus efficace dans les différents champs d'application. Les nanoparticules ciblées représentent une nouvelle et prometteuse classe d'agents thérapeutiques dans la médecine expérimentale avec une toxicité très basse par rapport à la thérapie conventionnelle. Le couplage avec l'imagerie *in vivo* pourra permettre de cibler très spécifiquement une maladie et de visualiser la réponse.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas-Terki, T., *et al.*, 2002 - *Lentiviral-mediated rna interference*. Hum Gene Ther 13, 2197-2201.
- Aukerman, M.J., and Sakai, H., 2003 - *Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its apetala2-like target genes*. Plant Cell 15, 2730-2741.
- Bartel, D.P., 2004 - *MicRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell 116, 281-297.
- Bartlett, D.W., *et al.*, 2007 - *Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality *in vivo* imaging*. Proc Natl Acad Sci U S A.
- Barton, G.M., and Medzhitov, R., 2002 - *Retroviral delivery of small interfering rna into primary cells*. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 14943-14945.
- Bernstein, E., *et al.*, 2001 - *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of rna interference*. Nature 409, 363-366.
- Brodersen, P., and Voinnet, O., 2006 - *The diversity of rna silencing pathways in plants*. Trends Genet 22, 268-280.
- Calin, G.A., *et al.*, 2002 - *Frequent deletions and down-regulation of micro- rna genes mir15 and mir16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 15524-15529.
- Caplen, N.J., and Mousses, S., 2003 - *Short interfering rna (siRNA)-mediated rna interference (RNAi) in human cells*. Ann N Y Acad Sci 1002, 56-62.
- Corney, D.C., *et al.*, 2007 - *Microrna-34b and microrna-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth*. Cancer Res 67, 8433-8438.
- Elbashir, S.M., *et al.*, 2001a - *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature 411, 494-498.
- Elbashir, S.M., *et al.*, 2001b - *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev 15, 188-200.
- Emery, J.F., *et al.*, 2003 - *Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes*. Curr Biol 13, 1768-1774.
- Fire, A., *et al.*, 1998 - *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature 391, 806-811.

- Hemann, M.T., *et al.*, 2003 - *An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable mai produces distinct tumor phenotypes in vivo*. Nat Genet 33, 396-400.
- Hohjoh, H., and Fukushima, T., 2007 - *Marked change in microRNA expression during neuronal differentiation of human teratocarcinoma ntera2d1 and mouse embryonal carcinoma p19 cells*. Biochem Biophys Res Commun 362, 360-367.
- Ichim, T.E., *et al.*, 2004 - *Rna interference: A potent tool for gene-specific therapeutics*. Am J Transplant 4, 1227-1236.
- Jensen, S., *et al.*, 1999 - *Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing*. Nat Genet 21, 209-212.
- Ji, J., *et al.*, 2003 - *Enhanced gene silencing by the application of multiple specific small interfering rnas*. FEBS Lett 552, 247-252.
- Katoh, T., *et al.*, 2003 - *Simple and rapid synthesis of sirna derived from in vitro transcribed shrna*. Nucleic Acids Res Suppl, 249-250.
- Kawasaki, H., and Taira, K., 2003 - *Short hairpin type of dsrnas that are controlled by trna(val) promoter significantly induce mai-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells*. Nucleic Acids Res 31, 700-707.
- Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W., 1998 - *Use of dsrna-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway*. Cell 95, 1017-1026.
- Kim, V.N., 2005 - *Small rnas: Classification, biogenesis, and function*. Mol Cells 19, 1-15.
- Lee, R.C., *et al.*, 1993 - *The c. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small rnas with antisense complementarity to lin-14*. Cell 75, 843-854.
- Lee, Y., *et al.*, 2003 - *The nuclear rnase iii drosha initiates microRNA processing*. Nature 425, 415-419.
- Lewis, B.P., *et al.*, 2003 - *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell 115, 787-798.
- Li, M.J., *et al.*, 2003 - *Inhibition of hiv-1 infection by lentiviral vectors expressing pol iii-promoted anti-hiv rnas*. Mol Ther 8, 196-206.
- Lingel, A., *et al.*, 2004 - *Nucleic acid 3'-end recognition by the argonaute2 paz domain*. Nat Struct Mol Biol 11, 576-577.
- Llave, C., *et al.*, 2002 - *Cleavage of scarecrow-like mrna targets directed by a class of arabidopsis mirna*. Science 297, 2053-2056.
- Lo, H.L., *et al.*, 2007 - *Inhibition of hiv-1 replication with designed mirnas expressed from rna polymerase ii promoters*. Gene Ther.
- Ma, X., *et al.*, 2005 - *Induction of apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells by antisurvivin oligonucleotides*. Oncol Rep 14, 275-279.
- Malinsky, S., *et al.*, 2000 - *New insights on homology-dependent silencing of i factor activity by transgenes containing orf1 in drosophila melanogaster*. Genetics 156, 1147-1155.
- Martinez, L.A., *et al.*, 2002 - *Synthetic small inhibiting rnas: Efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 14849-14854.
- McCaffrey, A.P., *et al.*, 2002 - *Rna interference in adult mice*. Nature 418, 38-39.
- Meng, F., *et al.*, 2006 - *Involvement of human micro-rna in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines*. Gastroenterology 130, 2113-2129.
- Meng, F., *et al.*, 2007 - *MicroRNA-21 regulates expression of the pten tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer*. Gastroenterology 133, 647-658.
- Metzler, M., *et al.*, 2004 - *High expression of precursor microRNA-155/bic rna in children with burkitt lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer 39, 167-169.
- Miao, Z.H., *et al.*, 2007 - *Nonclassic functions of human topoisomerase i: Genome-wide and pharmacologic analyses*. Cancer Res 67, 8752-8761.
- Mott, J.L., *et al.*, 2007 - *Mir-29 regulates mcl-1 protein expression and apoptosis*. Oncogene 26, 6133-6140.
- Napoli, C., *et al.*, 1990 - *Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans*. Plant Cell 2, 279-289.
- Novina, C.D., and Sharp, P.A., 2004 - *The mai revolution*. Nature 430, 161-164.
- Oelgeschlager, M., *et al.*, 2000 - *The evolutionarily conserved bmp-binding protein twisted gastrulation promotes bmp signalling*. Nature 405, 757-763.
- Palatnik, J.F., *et al.*, 2003 - *Control of leaf morphogenesis by microRNAs*. Nature 425, 257-263.
- Park, J.W., *et al.*, 2002a - *Anti-her2 immunoliposomes: Enhanced efficacy attributable to targeted delivery*. Clin Cancer Res 8, 1172-1181.
- Park, M.Y., *et al.*, 2005 - *Nuclear processing and export of microRNAs in arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 3691-3696.
- Park, W., *et al.*, 2002b - *Carpel factory, a dicer homolog, and hen1, a novel protein, act in microRNA metabolism in arabidopsis thaliana*. Curr Biol 12, 1484-1495.
- Qin, X.F., *et al.*, 2003 - *Inhibiting hiv-1 infection in human t cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering rna against ccr5*. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 183-188.
- Randall, G., *et al.*, 2003 - *Clearance of replicating hepatitis c virus replicon rnas in cell culture by small interfering rnas*. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 235-240.

- Reinhart, B.J., *et al.*, 2000 - *The 21-nucleotide let-7 rna regulates developmental timing in caenorhabditis elegans.* Nature 403, 901-906.
- Ren, J.L., *et al.*, 2006 - *Rna interference inhibits hepatitis b virus gene expression and replication in hepg2-n10 cells.* Chin J Dig Dis 7, 230-236.
- Ryther, R.C., *et al.*, 2004 - *Gh1 splicing is regulated by multiple enhancers whose mutation produces a dominant-negative gh isoform that can be degraded by allele-specific small interfering rna (sirna).* Endocrinology 145, 2988-2996.
- Schiffelers, R.M., *et al.*, 2004 - *Cancer sirna therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle.* Nucleic Acids Res 32, e149.
- Schwarz, D.S., *et al.*, 2003 - *Asymmetry in the assembly of the rna interference complex.* Cell 115, 199-208.
- Si, M.L., *et al.*, 2007 - *Mir-21-mediated tumor growth.* Oncogene 26, 2799-2803.
- Surowiak, P., 2003 - *Evaluation of transfection effectiveness using fluorescein-labelled oligonucleotides and various liposomes.* Folia Morphol (Warsz) 62, 397-399.
- Svoboda, P., *et al.*, 2000 - *Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by rna interference.* Development 127, 4147-4156.
- Tang, G., 2005 - *Sirna and mirna: An insight into riscs.* Trends Biochem Sci 30, 106-114.
- Vaucheret, H., and Fagard, M., 2001 - *Transcriptional gene silencing in plants: Targets, inducers and regulators.* Trends Genet 17, 29-35.
- Wightman, B., *et al.*, 1993 - *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in c. Elegans.* Cell 75, 855-862.
- Xia, H., *et al.*, 2002 - *Sirna-mediated gene silencing in vitro and in vivo.* Nat Biotechnol 20, 1006-1010.
- Xu, P., *et al.*, 2003 - *The drosophila microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism.* Curr Biol 13, 790-795.
- Yang, G., *et al.*, 2003 - *Silencing of h-ras gene expression by retrovirus-mediated sirna decreases transformation efficiency and tumorigrowth in a model of human ovarian cancer.* Oncogene 22, 5694-5701.
- Yekta, S., *et al.*, 2004 - *Microrna-directed cleavage of hoxb8 mRNA.* Science 304, 594-596.
- Zhan, M., *et al.*, 2007 - *Microrna expression dynamics during murine and human erythroid differentiation.* Exp Hematol 35, 1015-1025.
- Zhang, B., *et al.*, 2007 - *Micrornas as oncogenes and tumor suppressors.* Dev Biol 302, 1-12.

- 1) Université Paris7-Denis Diderot, Inserm U728, France ;
 2) Université Alexandru Ioan Cuza, Roumanie