

Séance du 19 décembre 2022

Le monde émergent des ARN : leurs rôles dans le contrôle de l'expression génétique et leurs utilisations comme médicaments.

Bernard LEBLEU

Professeur Émérite Université de Montpellier

MOTS-CLÉS

ARN messenger, épissage des ARN, ARN interférence, ARN non codants, régulation expression des gènes, applications cliniques, vaccin ARNm

RÉSUMÉ

Malgré la découverte du rôle joué par les ARN messagers, l'ADN est resté longtemps considéré comme le site majeur de régulation de l'expression des gènes. La découverte de la structure morcelée des gènes eucaryotes et des possibilités de réassortiment d'exons lors de l'épissage des précurseurs d'ARNm a ouvert de nouvelles perspectives de régulation au niveau post-transcriptionnel. De même, la mise en évidence des gènes responsables de l'ARN interférence et d'autres classes d'ARN non codants a révélé de nouveaux mécanismes de régulation. Des dysfonctionnements de ces mécanismes ont été montrés, associés à de nombreuses maladies génétiques ou acquises. Enfin, de petits fragments d'acides nucléiques (appelés oligonucléotides) ou les ARNm eux-mêmes peuvent être synthétisés chimiquement et utilisés comme médicaments pour traiter des maladies jusqu'ici incurables ou pour vacciner.

Introduction

La formule « Tout est dans votre ADN », souvent galvaudée par les journalistes et les politiques, n'est sans doute que partiellement vraie, même si l'ADN est bien le support de l'information génétique. Comme nous l'évoquerons dans cet exposé, les informations encodées dans un gène sont transcrites en une séquence complémentaire d'ARN messenger (ARNm) pour être décodées ensuite par la machinerie de traduction et donner naissance à une protéine. Tous les gènes d'une cellule, et plus encore d'un organisme pluricellulaire, ne sont pas exprimés à tout moment et au même rythme. Ainsi, par exemple, est-il évident que les cellules spécialisées de notre cerveau, de notre peau ou de notre foie produisent chacune des protéines spécifiques. Pendant plus d'une décennie après la découverte des ARNm par André Lwoff, François Jacob et Jacques Monod l'attention est cependant restée centrée sur l'ADN comme site de régulation de l'expression des gènes tant chez les cellules eucaryotes que chez les bactéries.

Deux découvertes fondamentales et surprenantes ont établi le rôle d'autres sites importants de régulation de l'expression génétique dans les cellules eucaryotes : l'épissage des ARNm et l'ARN interférence, dont nous évoquerons la découverte, le mécanisme et les applications en clinique. Enfin, nous décrirons quelques exemples d'utilisation thérapeutique des ARNm dont l'intérêt a été démontré dans la vaccination contre le virus SARS-Cov2.

L'émergence du concept d'ARN messager

La nécessité d'un intermédiaire entre ADN et protéines était évidente dans la mesure où l'ADN des gènes est localisé dans le noyau des cellules eucaryotes alors que la synthèse des protéines par les ribosomes se fait dans leur cytoplasme. Mes enseignants à l'Université Libre de Bruxelles y étaient particulièrement sensibles et leurs recherches personnelles y étaient largement consacrées. Ainsi par exemple, le Professeur Jean Brachet, embryologiste de renom, nous évoquait-il ses expériences sur l'algue unicellulaire *Acetabularia mediterranea* dont l'ADN est concentré dans le chapeau alors que la synthèse des protéines se fait dans la tige. Ceci n'empêche pas l'algue débarrassée expérimentalement de son chapeau de continuer à synthétiser ses protéines. J'ai, par ailleurs, eu la chance d'effectuer ma Thèse de Doctorat dans le laboratoire du Professeur Hubert Chantrenne où venait d'être mis en évidence dans les réticulocytes de lapin une nouvelle espèce d'ARN. Ses propriétés faisaient penser qu'il devait être l'ARNm responsable de la synthèse des chaînes de globine de l'hémoglobine. Le choix des réticulocytes était judicieux dans la mesure où ces précurseurs des globules rouges du sang ont perdu leur noyau, mais continuent à synthétiser abondamment de l'hémoglobine pendant plusieurs jours. L'essentiel de mes travaux de thèse a consisté à apporter des arguments complémentaires à l'identification de cet ARN, car, malheureusement, les technologies permettant de traduire *in vitro* un ARNm en protéine ne deviendraient disponibles que quelques années plus tard. Les propriétés de cet ARN correspondaient parfaitement au concept d'ARNm qui avait valu à Lwoff, Jacob et Monod l'obtention, quelques années plus tôt, du prix Nobel de Physiologie et Médecine sans pour autant qu'ils aient réussi à isoler un ARNm bactérien. Les technologies de la biochimie (et de la biologie moléculaire naissante) mises en jeu dans notre laboratoire avaient ainsi apporté un nouvel éclairage à la démonstration faite par les outils génétiques à l'Institut Pasteur. L'avènement des stratégies de clonage des gènes et de leurs produits allait, quelques années plus tard, impulser une formidable accélération à l'étude de l'expression des gènes et de leur régulation et nous allons maintenant en évoquer quelques aspects.

La structure en mosaïque des gènes eucaryotes

La structure des gènes et leurs modalités d'expression ont été essentiellement étudiées chez la bactérie *Escherichia coli* dont la production à grande échelle est peu coûteuse (facilitant ainsi l'isolement et la caractérisation de ses constituants) et la génétique bien développée. Les expériences réalisées avec des organismes eucaryotes modèles comme les levures ou les souris avaient amené à postuler que l'organisation des gènes et leur régulation étaient conservées entre organismes procaryotes et eucaryotes.

La découverte dans les années 70 de la structure dite en mosaïque des gènes eucaryotes, que ce soit chez les levures, les animaux ou les plantes, fut une immense surprise et valut à Richard Roberts et Philip Sharp l'octroi du prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1977.

À la différence des gènes bactériens, les gènes eucaryotes sont constitués d'une alternance de deux types de séquences appelées exons et introns. L'entièreté du gène est transcrite dans le noyau des cellules par les ARN polymérases en un précurseur d'ARNm qui ne s'accumule pas. Une machinerie très complexe dite d'épissage va rapidement repérer au nucléotide près les frontières entre les exons et les introns, exciser les exons et les recoller bout à bout en éliminant les introns. Une fois cette opération terminée, les ARNm matures sont exportés du noyau au cytoplasme pour être pris en charge par les ribosomes et être traduits. L'intérêt de cette étape est devenu clair avec la découverte des

épissages dits alternatifs. Ce processus fréquent entraîne des réassortiments d'exons avec pour conséquence de générer plusieurs ARNm apparentés (et en conséquence plusieurs protéines) à partir d'un seul gène. Ceci permet d'expliquer pour une large part comment plusieurs centaines de milliers de protéines sont produites chez l'homme à partir des 20 000 gènes codant les ARNm de son génome.

Comme on pouvait s'y attendre de mécanismes aussi complexes, des erreurs d'épissage peuvent se produire et de nombreuses maladies y sont associées. De nouvelles stratégies ont été mises au point pour corriger un épissage défectueux ou déplacer la balance d'une forme d'épissage à une autre. Elle consiste à introduire dans la cellule un petit fragment d'acide nucléique (appelé oligonucléotide) dont la séquence va lui permettre de venir s'associer spécifiquement à une frontière intron/exon pour, par exemple, empêcher l'inclusion de cet exon dans l'ARNm. Cette stratégie dite de saut d'exon est déjà utilisée en clinique pour soigner des maladies génétiques jusqu'ici incurables comme l'atrophie musculaire spinale (SMA).

L'ARN interférence, une nouvelle stratégie de régulation de l'expression génétique

Le séquençage du génome humain a démontré que seule une petite partie est responsable de la synthèse des ARNm. Le rôle des séquences dites non codantes est resté longtemps inconnu et désigné par le terme d'ADN « poubelle ». On sait maintenant qu'une grande partie de ces régions est transcrite en ARN dits non codants qui assurent d'importantes fonctions régulatrices dans la cellule.

Parmi les plus étudiés figurent les gènes codant les micro RNA (miRNA) responsables de l'ARN interférence, un mécanisme totalement nouveau de régulation de l'expression génétique découvert en 1998 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* par Andrew Fire et Craig Mello (Prix Nobel de Physiologie et Médecine, 2006). Le produit de transcription des gènes codant ces miRNA subit un processus complexe de maturation dans le noyau cellulaire qui les dégrade en fragments plus petits appelés siRNA (pour petits ARN interférents). Ces siRNA s'associent à un complexe multiprotéique et reconnaissent l'ARNm cellulaire (ou viral) dont la séquence est complémentaire. La ribonucléase associée à ce complexe est alors activée et dégrade spécifiquement l'ARNm cible tout en laissant intact le siRNA lui-même qui va ainsi pouvoir être recyclé. Il s'agit d'un mécanisme extrêmement efficace de régulation des populations d'ARNm dont on n'a pas encore terminé l'inventaire. La plupart des ARNm sont la cible d'un ou plusieurs siRNA et plusieurs pathologies ont d'ores et déjà été associées à un défaut d'expression (ou à la surexpression) d'un miRNA, anomalies qui peuvent être corrigées avec les outils de la thérapie génique.

Une stratégie très prometteuse consiste à synthétiser chimiquement un siRNA dont la séquence a été conçue pour venir s'associer à un ARNm cible. Son introduction dans une cellule entraînera la dégradation spécifique de cet ARNm cible. Ces technologies faciles à mettre en œuvre sont utilisées en routine comme outils de recherche fondamentale : détruire un ARNm et en étudier l'impact sur le fonctionnement d'une cellule est effectivement l'un des meilleurs moyens de comprendre son rôle dans la physiologie cellulaire *in vitro* ou *in vivo*. Des applications cliniques peuvent aussi être envisagées dans le cas de pathologies génétiques ou acquises associées à la surexpression d'un gène ou à l'expression d'un mutant dont l'expression est délétère. Plusieurs sociétés de biotechnologies (dont Alnylam Pharmaceuticals à Boston) ont développé avec succès de telles approches et une dizaine de médicaments exploitant ce principe d'ARN interférence ont reçu des autorisations de mise sur le marché de la Food and Drug

Administration et de son homologue européenne. Les premiers de ces médicaments concernaient des maladies génétiques, mais une nouvelle application vient d'être développée par Alnylam (et mise sur le marché par Novartis) pour le traitement de certaines formes d'hypercholestérolémie et la prévention des complications cardiovasculaires, un marché d'une toute autre ampleur qui pourrait venir se substituer aux traitements actuels par les statines.

La principale limitation actuelle de ces nouvelles stratégies concerne la pénétration de ces petits fragments d'acides nucléiques (qu'il s'agisse des oligonucléotides modulant l'épissage ou des siRNA) dans les cellules. Plusieurs formulations se sont avérées efficaces pour promouvoir leur internalisation dans le foie et la plupart des applications cliniques actuelles concernent des maladies associées à cet organe. De nombreux travaux sont en cours pour cibler d'autres organes comme le système nerveux central, les muscles ou les poumons.

Les ARN messagers, nouveaux outils pour la vaccination et pour la production de protéines thérapeutiques

Le succès des vaccins à ARNm proposés par BioNTech/Pfizer et par Moderna dans le traitement de la pandémie SARS/Cov2 a révélé le formidable potentiel d'applications cliniques des ARNm. Contrairement à ce qui a parfois été avancé et qui fut source d'inquiétudes, la mise au point de cette nouvelle stratégie est le fruit d'études poursuivies depuis de nombreuses années. Les stratégies évoquées plus haut mettaient en œuvre des acides nucléiques de petite taille que ce soient les oligonucléotides modulant l'épissage ou les siRNA. Les ARNm sont des entités chimiques beaucoup plus complexes comportant plusieurs centaines voire des milliers de nucléotides. Les modifier pour leur permettre de n'être pas trop rapidement dégradés tout en maintenant leur capacité à être reconnus par la machinerie complexe de traduction n'était évidemment pas facile à mettre en œuvre. Un autre challenge était de leur permettre de traverser les membranes biologiques comme déjà évoqué. L'incorporation des ARNm dans une enveloppe de lipides s'est avérée une solution satisfaisante à ces deux problèmes grâce aux travaux menés depuis de nombreuses années par plusieurs équipes américaines.

Une difficulté rarement évoquée et pourtant critique pour une application en clinique réside dans l'existence de cellules spécialisées qui reconnaissent les ARNm comme « agresseurs potentiels car étrangers » et enclenchent une réponse inflammatoire destinée à les éliminer. Les travaux de recherche fondamentale menés depuis plus de 10 ans par Katalin Kariko et Drew Weissmann ont permis de s'affranchir de ce problème et leur ont valu l'octroi de plusieurs distinctions scientifiques.

Contrairement donc aux idées répandues, tous les outils nécessaires à l'utilisation des ARNm comme outils thérapeutiques étaient en place au moment où s'est déclarée la pandémie actuelle. Les sociétés BioNTech et Moderna travaillaient en particulier sur des vaccins à ARNm destinés à d'autres applications thérapeutiques. Il leur fut donc facile de changer la séquence de l'ARNm pour qu'il produise une protéine vaccinnante, en l'occurrence une protéine de l'enveloppe du virus SARS-Cov2. Comme nous l'avons vu, le succès fut très rapide avec un démarrage des premiers essais cliniques quelques mois à peine après le déchiffrement de la séquence du génome viral. Ces vaccins à ARNm constituent une stratégie complètement nouvelle de vaccination et comportent *a priori* nettement moins de risques que les vaccins utilisés jusqu'ici, car de composition beaucoup plus simple, et entièrement synthétisés chimiquement. De plus, l'ARNm vaccinant est rapidement dégradé dans les cellules, ce qui diminue les risques d'effets secondaires. Enfin, la séquence d'un ARNm peut être facilement modifiée pour produire

un vaccin de seconde génération capable de reconnaître les mutants qui ont émergé et continueront sans doute à le faire. Comme attendu, ce succès a suscité de nombreux travaux de recherche fondamentale et appliquée par des acteurs publics ou industriels. De nouvelles stratégies visant par exemple à mieux cibler l'ARNm vers un type cellulaire ou à en augmenter l'efficacité sont en train d'émerger. Ceci sera particulièrement important pour l'utilisation d'ARNm comme alternative à la production de protéines recombinantes comme les cytokines ou les anticorps, un secteur déjà très développé des biotechnologies.

Conclusion

La mise au point d'outils de plus en plus performants d'analyse des génomes et de leurs produits d'expression a permis d'en révéler la complexité et d'associer des dysfonctionnements de ces mécanismes à des maladies génétiques ou acquises. Ces données ont permis de concevoir rationnellement des stratégies de correction de ces anomalies et l'émergence de nouvelles approches thérapeutiques. Une accélération formidable de la transposition en clinique (ou « clinical translation ») des découvertes faites en laboratoire marque notre époque comme en a témoigné de manière éclatante le succès de la vaccination contre le COVID. Ne nous méprenons pas néanmoins et ne baissons pas la garde, car de nouvelles maladies d'origine infectieuse ou autres émergeront et nécessiteront d'accroître nos potentiels de recherche fondamentale et appliquée grâce à des investissements publics et privés adéquats.

POUR EN SAVOIR PLUS :

Arnold Berk, Harvey Lodish, Angelika Amon, Anthony Bretscher, Chris A Kaiser, Monty Krieger, Hidde Ploegh, Kelsey C. Martin et Michael B. Yaffe *Biologie moléculaire de la cellule* (5^{ème} édition, 2022, édition DeBoeck)