

Oligonucléotides « sens » : ligands rationnels des facteurs de transcription

Une nouvelle voie de recherche thérapeutique s'ouvre avec les oligonucléotides sens, utilisés comme ligands compétitifs de protéines qui se fixent naturellement à des séquences particulières d'ADN ou d'ARN et sont indispensables à l'expression ou à la réplication des gènes. Peuvent ainsi être ciblés les facteurs de transcription, mais aussi les enzymes de réplication, de maturation des transcrits et, plus généralement, toute protéine intervenant à une étape quelconque dans l'expression de gènes particuliers. Un effort important de recherche est consacré à l'obtention de molécules plus stables que les oligonucléotides linéaires (molécules en haltères ou *dumbbells*), présentant une forte affinité pour leur cible, voire capables de se lier de façon covalente à la protéine cible, tout en conservant leur grande spécificité. Ces nouveaux outils thérapeutiques pourraient permettre de lutter de façon spécifique contre les affections tumorales et virales.

Marta Blumenfeld
Marc Vasseur

ADRESSE

M. Blumenfeld : docteur ès-sciences, directeur du département de recherche thérapeutique de Genset. M. Vasseur : professeur à l'université Paris-VII, directeur scientifique de Genset. Genset, 1, passage Étienne-Delaunay, 75011 Paris, France et 505 Coast Bd South, La Jolla, CA, USA.

Les oligonucléotides de synthèse permettent de moduler de façon artificielle l'expression des gènes eucaryotes (voir l'article de C. Hélène et E. Saison-Behmoaras, p. 253 de ce numéro et [1]). En tirant partie des propriétés d'appariement hautement spécifiques d'un oligonucléotide à sa séquence complémentaire, on peut interférer de façon rationnelle avec l'expression génique à différents niveaux. L'approche la plus classique et la plus couramment utilisée est l'approche antisens, dans

laquelle un oligonucléotide de séquence complémentaire à une région d'ARN messenger ou pré-messenger permet, en s'hybridant à sa cible, de bloquer spécifiquement son expression. Il est également possible de diriger des oligonucléotides contre l'ADN lui-même ; c'est l'approche « anti-gène » ou « anti-code ». Par exemple, un oligonucléotide peut reconnaître une séquence spécifique dans la région promotrice d'un gène, former ainsi une triple hélice et inhiber la transcription.

Plus récemment, les cibles des oligo-

nucléotides se sont élargies aux protéines. Par exemple, on peut sélectionner *in vitro*, à partir de synthèses aléatoires, des molécules d'ADN ou d'ARN simple brin qui adoptent des structures tridimensionnelles leur permettant de former des complexes très stables avec les protéines ciblées et de bloquer ainsi leurs fonctions (approche « aptamère ») [2].

De façon rationnelle, on peut également utiliser des oligonucléotides comme ligands compétitifs de protéines qui se fixent naturellement à l'ADN ou à l'ARN sur des séquences spécifiques. On peut ainsi cibler des facteurs de transcription, des enzymes de réplication, et de façon générale toute protéine possédant un site de fixation à une séquence particulière d'ADN ou d'ARN. On se place ici dans une approche de pharmacologie classique, où l'on cherche à déplacer un équilibre en fournissant un ligand artificiel (l'oligonucléotide) à un « récepteur » cellulaire particulier, et donc en empêchant ce récepteur de fixer son ligand naturel (une séquence d'ADN ou d'ARN, cellulaire ou viral). Cette approche est appelée stratégie « sens ». En utilisant des oligonucléotides de synthèse - ou des acides nucléiques exprimés dans des cellules à partir de vecteurs - comportant la séquence reconnue par la protéine ciblée, on peut donc envisager d'inhiber des interactions spécifiques entre acides nucléiques et protéines, et donc de bloquer les processus contrôlés par ces interac-

tions (par exemple, la réplication d'un génome, la transcription de gènes...).

Parmi toutes les cibles possibles de cette stratégie sens, certaines protéines se liant à l'ADN et agissant sur la transcription (facteurs de transcription) sont particulièrement intéressantes du point de vue thérapeutique. C'est cette approche qui est poursuivie dans nos laboratoires. Le choix des facteurs de transcription comme cible est justifié par : (1) la diversité qu'ils offrent ; (2) les fortes affinités et spécificités avec lesquelles ils se lient à leurs séquences de reconnaissance ; (3) la spécificité du contrôle qu'ils exercent sur l'expression génique ; et (4) leur implication dans de nombreuses affections humaines.

La régulation de l'expression génique chez les eucaryotes

L'expression du programme génétique obéit à des contrôles qui spécifient, pour chaque type de gène, où, quand et à quel niveau il doit être exprimé. On sait que la régulation de l'expression des gènes codant pour les protéines (transcrits par l'ARN polymérase II) s'effectue principalement au niveau du contrôle de l'initiation de la transcription [3]. Cette régulation dépend de l'interaction spécifique entre des protéines, les facteurs de transcription, et de courtes séquences d'ADN que l'on trouve dans les promoteurs des gènes [4]. Les promoteurs des gènes

transcrits par l'ARN polymérase II se situent en amont du site de démarrage de la transcription, et comportent deux classes de séquences d'ADN : les éléments du promoteur responsables de l'activité transcriptionnelle basale, et les éléments du promoteur responsables de l'activité transcriptionnelle réglable (*figure 1*). Le promoteur basal sert à la formation d'un complexe multiprotéique (complexe d'initiation de la transcription), comportant l'ARN polymérase II et des protéines auxiliaires (facteurs de transcription généraux ou GTF, *general transcription factors*). L'assemblage séquentiel des GTF et de l'ARN polymérase II sur le promoteur basal permet de former le complexe d'initiation qui est capable d'assumer une initiation correcte, mais très peu efficace, de la synthèse des ARN messagers [3].

L'activité de la machinerie basale de transcription est à son tour contrôlée par l'action combinée de plusieurs facteurs de transcription (facteurs spécifiques), dont la présence va déterminer la fréquence des initiations de la transcription et permettre toutes sortes de contrôles par des signaux cellulaires ou extracellulaires. Les régulateurs transcriptionnels incluent non seulement des protéines se fixant à des séquences spécifiques dans le promoteur proximal ou distal (amplificateur) des gènes, mais aussi des protéines se liant elles-mêmes à ces facteurs (coactivateurs ou médiateurs) [3].

La spécificité tissulaire ou temporelle, ainsi que le niveau d'expression d'un ARN messager donné, résulte donc de cette combinatoire spécifique de régulateurs transcriptionnels interagissant avec le promoteur du gène et interagissant entre eux. Dans la majorité des cas, la fixation d'un - ou de - facteur(s) de transcription concourt à une activation de l'expression du gène, mais il existe des situations où la fixation d'un facteur de transcription aboutit à une inhibition de la transcription [5].

L'approche sens a un sens

Dans le cas le plus simple, la fixation d'un facteur de transcription spécifique sur sa séquence de recon-

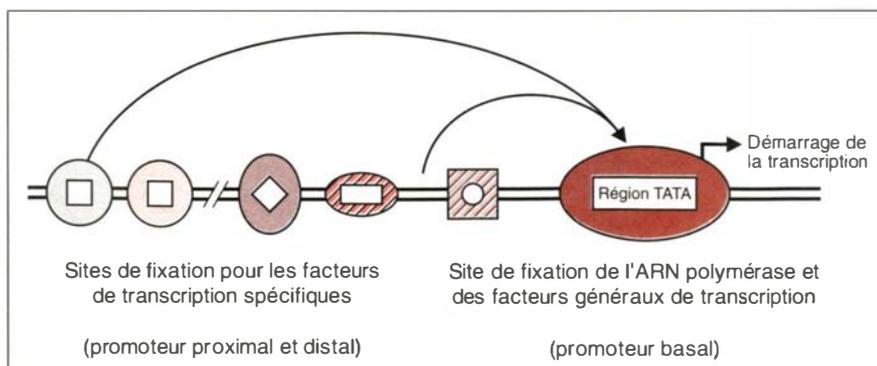


Figure 1. Représentation schématique de la région promotrice des gènes transcrits par l'ARN polymérase II.

RÉFÉRENCES

1. Hélène C, Toulmé JJ. Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1049: 99-125.
 2. Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990; 346: 818-22.
 3. Pugh BF, Tjian R. Diverse transcriptional functions of the multisubunit eukaryotic TFIID complex. *J Biol Chem* 1992; 267: 679-82.
 4. Angrand PO. Les domaines de liaison à l'ADN des facteurs de transcription eucaryotes. *médecine/sciences* 1993; 9: 725-36.
 5. Herschbach BM, Johnson AD. Transcriptional repression in eukaryotes. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 479-509.
 6. Harel-Bellan A, Brini AT, Ferris DK, Robin P, Farrar WL. *In situ* detection of a heat-shock regulatory element binding protein using a soluble short synthetic enhancer sequence. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 4077-87.
 7. Ngô V, Laverrière JN, Gourdj D. Binding capacity and *cis*-acting efficiency of DNA regulatory sequences can be distinguished in an *in vivo* competition assay. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 5795-6.
 8. Faisst S, Meyer S. Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 3-26.
 9. Cereghini S, Blumenfeld M, Yaniv M. A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes Dev* 1988; 2: 957-74.
 10. Wu H, Holcenberg JS, Tomich J, Chen J, Jones PA, Huang SH, Calame KL. Inhibition of *in vitro* transcription by specific double-stranded oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 1990; 89: 203-9.
 11. Dostatni N, Lambert PF, Sousa R, Ham J, Howley PM, Yaniv M. The functional BPV-1 E2 *trans*-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev* 1991; 5: 1657-71.
- naissance localisée dans un promoteur aboutira donc à l'activation de la transcription à partir de ce promoteur (figure 1). L'inhibition de la fixation d'un tel régulateur transcriptionnel sur un promoteur dont il contrôle l'activité devrait donc modifier de façon considérable l'efficacité de la transcription. Cette inhibition peut-elle être réalisée par compétition? Tous les chercheurs ayant étudié *ex vivo* ou *in vitro* l'activité des promoteurs clonés dans des vecteurs connaissent bien la réponse à cette question. La compétition entre promoteurs pour des facteurs de transcription, présents en quantité limitante, est fréquemment observée lorsque l'on étudie la régulation de la transcription par des expériences d'expression transitoire de vecteurs dans des cellules de mammifères, ou bien par transcription dans des extraits cellulaires. Cette compétition peut se produire, soit lorsqu'on cotransfecte ou cotranscrit des plasmides contenant des éléments régulateurs communs (comme dans le cas de la cotransfection ou la cotranscription d'un vecteur *reporter* avec un vecteur de référence), soit lorsqu'on effectue des mesures de dose-réponse avec un seul vecteur *reporter* [6, 7]. Cette compétition entre promoteurs suggère donc qu'un facteur de transcription donné pourrait être quantitativement détourné de sa cible naturelle par des molécules compétitives comportant uniquement la séquence d'ADN qu'il reconnaît. L'inhibition de l'activité biologique d'un régulateur transcriptionnel par compétition avec des pièges oligonucléotidiques comportant sa séquence spécifique de fixation devrait donc permettre de moduler l'expression des gènes placés sous le contrôle du facteur de transcription ciblé.

Le ciblage spécifique des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription qui reconnaissent une séquence d'ADN [8] sont capables, *in vitro*, de se fixer sur des oligonucléotides bicaténaires comportant cette séquence. Cette propriété a été

amplement exploitée pour analyser les sites de fixation par la technique de retard sur gel. La fixation des facteurs de transcription sur des oligonucléotides bicaténaires a également permis d'effectuer des expériences de compétition *in vitro* dans des extraits nucléaires. On peut ainsi inhiber la transcription de gènes placés sous le contrôle de divers facteurs de transcription comme HNF1 (*hepatocyte nuclear factor 1*, facteur de transcription hépatique) [9], SP1 (facteur de transcription ubiquitaire se fixant à une boîte GC) [10], E2 (transactivateur de la transcription et de la réplication du génome des virus du papillome) [11], entre autres.

Plusieurs travaux montrent que ce principe est également applicable à l'inhibition compétitive de l'expression génique *ex vivo*. Ainsi, des oligonucléotides bicaténaires contenant la séquence CRE (*cAMP response element*), injectés dans les cellules 3T3, bloquent l'induction du gène *c-fos* par l'AMPc [12]. De même, la microinjection d'oligonucléotides comportant le site API bloque la réponse de fibroblastes humains Hs68 à l'induction par des facteurs de croissance [13]. Il est également possible d'utiliser des oligonucléotides modifiés, composés de phosphorothioates au lieu de phosphodiesteres. Des oligonucléotides phosphorothioates bicaténaires comportant la séquence NF- κ B ou Oct-1, cotransfectés dans des cellules transformées par le virus d'Epstein-Barr, inhibent la transcription de vecteurs VIH-CAT ou Oct-CAT [14].

Plus récemment, nous avons montré qu'il était possible d'utiliser des oligonucléotides fermés (*dumbbells*, en « haltères », figure 2), pour inhiber spécifiquement l'expression d'un gène de façon compétitive. Les oligonucléotides *dumbbells* sont des oligonucléotides circulaires, comportant une structure bicaténaire auto-appariée, et une boucle à chaque extrémité [15, 16]. Avec de tels oligonucléotides, nous avons montré qu'il était possible d'inhiber de façon spécifique, et à des concentrations faibles, de l'ordre du nanomolaire, l'expression d'un gène *reporter* placé sous le contrôle du facteur de transcription HNF1 (figure 2 et [17]).

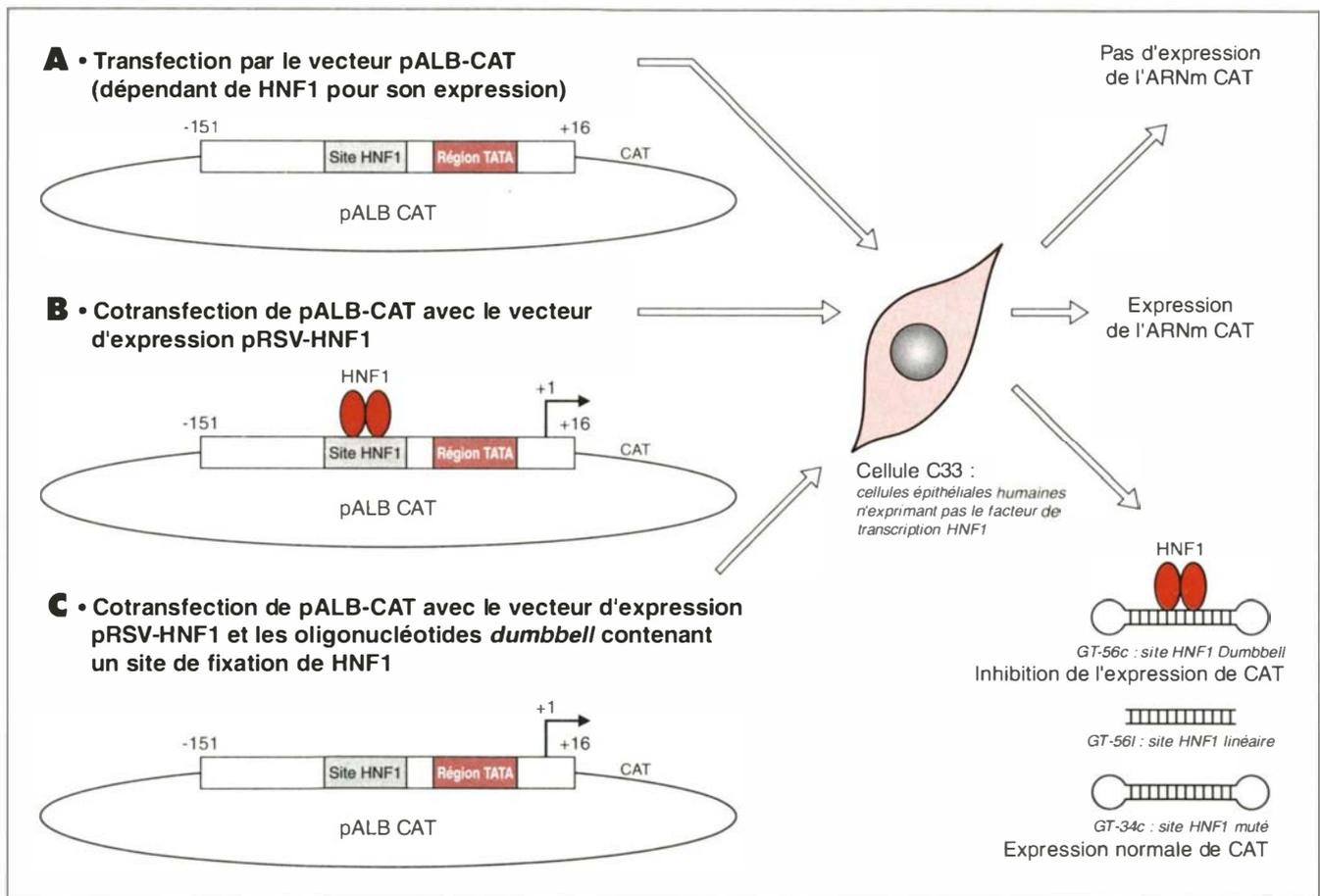


Figure 2. **Schéma illustrant l'inhibition spécifique du facteur de transcription hépatique HNF1 (hepatic nuclear factor 1) dans des cellules épithéliales humaines C33 par des oligonucléotides en haltères (dumbbells) contenant le site de fixation de HNF1.** Le promoteur du gène de l'albumine de rat (pALB) contient une séquence de fixation pour le facteur de transcription HNF1 dont la présence est indispensable à l'expression de ce promoteur. Ce schéma résume les expériences d'expression transitoire après transfection de divers plasmides avec ou sans oligonucléotides sens dans des cellules C33. **A :** les cellules C33, ne contenant pas HNF1, ne peuvent pas exprimer le gène reporter CAT contrôlé par le promoteur de l'albumine (pALB-CAT). **B :** la protéine HNF1, exprimée à partir du vecteur cotransfecté pRSV-HNF1, peut se fixer sur son site spécifique sur le promoteur du gène reporter pALB-CAT, et activer la transcription du gène CAT. **C :** des oligonucléotides en haltères (dumbbells) contenant le site de fixation de HNF1 (GT-56c), inhibent de façon compétitive la fixation de HNF1 sur le promoteur albumine dans le vecteur pALB-CAT, et empêchent donc HNF1 d'activer la transcription du gène CAT. En revanche, des oligonucléotides HNF1 linéaires (GT-56l) ou des oligonucléotides en haltères contenant un site muté qui n'est plus reconnu par HNF1 (GT-34c) ne sont pas capables d'inhiber la fixation de HNF1 sur le promoteur de pALB-CAT et n'ont pas d'effet sur l'expression du gène CAT.

RÉFÉRENCES

12. Berkowitz IA, Riabowol KT, Gilman MZ. Multiple sequence elements of a single functional class are required for cyclic AMP responsiveness of the mouse *c-fos* promoter. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 4272-81.
13. Riabowol K, Schiff J, Gilman MZ. Transcription factor AP-1 activity is required for initiation of DNA synthesis and is lost during cellular aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 157-61.
14. Bielinska A, Shivdasani RA, Zhang L, Nabel GJ. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science* 1990; 250: 997-1000.
15. Chu BCF, Orgel LE. Binding of hairpin and dumbbell DNA to transcription factors. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 6958.
16. Blumenfeld M, Brandys P, D'Auriol L, Vasseur M. Oligonucléotides fermés, antisens et sens, et leurs applications. Demande de brevet français N° 9105114, avril 1991.
17. Clusel C, Ugarte E, Enjolras N, Vasseur M, Blumenfeld M. *Ex vivo* regulation of specific gene expression by nanomolar concentration of double-stranded dumbbell oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3405-11.
18. Rayter SI, Iwata KK, Michitsch RW, Sorvillo JM, Valenzuela DM, Foulkes JG. Biochemical functions of oncogenes. In: Glover DM, Hames BD, eds. *Oncogenes*. Oxford: IRL Press, 1989: 113-89.
19. Cleary ML. Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell* 1991; 66: 619-22.
20. Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, Emanuel BS, Rovera G, Barr FG. Fusion of a fork head domain gene to *PAX3* in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature Genet* 1993; 5: 230-5.
21. Degos L, Castaigne S, Fenaux P, Daniel MT, Chomienne C. Le traitement des leucémies aiguës à promyélocytes par l'acide tout-trans rétinolique. *médecine/sciences* 1991; 7: 460-4.
22. McDonnell DP, Vegeto E, Gleason MAG. Nuclear hormone receptors as targets for new drug discovery. *Biotechnology* 1993; 11: 1256-61.

Tous ces résultats convergent pour montrer qu'une approche de type sens est envisageable dans l'environnement cellulaire normal. Comme pour les approches antisens, il est clair que les problèmes de pénétration et de ciblage des oligonucléotides sens sont des aspects qui restent encore largement à développer. Tous les résultats résumés ci-dessus ont été obtenus alors que les oligonucléotides sens étaient introduits dans les cellules, soit par transfection, soit par micro-injection. Ces expériences démontrent cependant que des oligonucléotides peuvent piéger des facteurs de transcription de façon spécifique, à des concentrations faibles et compatibles avec un usage thérapeutique, pour inhiber l'expression d'un gène associé à une maladie.

Pathologie des facteurs de transcription

Les travaux de pathologie moléculaire ont permis de découvrir que l'étiologie de nombreuses maladies pouvait se situer au niveau des facteurs de transcription.

Un des meilleurs exemples est celui des oncogènes activés dans les tumeurs humaines. Plusieurs oncogènes - ou anti-oncogènes - sont des facteurs de transcription. Les modifications chromosomiques qui affectent leurs gènes peuvent conduire à des dysfonctionnements dans leur capacité de contrôler l'expression de gènes impliqués dans la prolifération ou la différenciation cellulaire. Par exemple, les facteurs de transcription de la famille Myc, qui font partie des protéines affines pour l'ADN possédant le motif hélice-boucle-hélice (bHLH pour *basic-helix-loop-helix*) [4], peuvent être activés par amplification directe du nombre de copies du gène (cas de *c-myc* dans des carcinomes du poumon et du colon, de *N-myc* dans des neuroblastomes, des cancers du poumon à petites cellules, des astrocytomes, des gliomes, de *L-myc* dans des cancers du poumon à petites cellules), ou par surexpression après translocation chromosomique (lymphome de Burkitt par exemple) [18, 19]. Les oncogènes *lyl-1* et *tal/scl* qui font partie de la même famille bHLH

peuvent également être activés par translocation dans certaines leucémies T [19].

Ce mode d'activation se retrouve pour d'autres oncogènes appartenant à la classe des facteurs à homéodomains (*Hox-11*), ou à la classe des facteurs à doigts de zinc (*Tgt/Rhom-1* et *Rhom-2*), dont on trouve des formes transloquées dans des leucémies T [19].

Dans d'autres cas, un gène codant pour un facteur de transcription sera fusionné à un autre gène, produisant ainsi une protéine hybride, possédant toujours un domaine fonctionnel de fixation à l'ADN mais n'obéissant plus à ses régulations normales. Par exemple, le gène *E2A*, qui code pour une protéine à motif bHLH appelée E12/E47, est fusionné par translocation au gène *PBX1* (qui est lui-même un homéogène) dans des leucémies aiguës pré B de l'enfant [19]. Dans des rhabdomyosarcomes alvéolaires, on retrouve une translocation qui produit un facteur de transcription réarrangé comprenant le domaine de fixation à l'ADN de l'homéoprotéine *PAX3* fusionné au domaine C-terminal de *FKHR* (protéine de la famille *fork head domain*) [20].

Un cas particulièrement intéressant est celui des leucémies promyélocytaires aiguës qui se caractérisent par une translocation impliquant le gène *PML* et celui codant pour le *RAR α* (récepteur de l'acide rétinolique) [21]. Cette translocation implique une autre famille de facteurs de transcription, celle des récepteurs nucléaires contrôlés par des hormones diffusibles.

Dans tous ces différents cas, le facteur de transcription est modifié ou exprimé à un niveau très élevé, et une stratégie de titrage de type sens est adaptée pour tenter de corriger cette expression anormale.

Le cas le plus simple impliquant des facteurs de transcription est cependant celui des maladies infectieuses, en particulier des maladies virales. La grande majorité des virus utilisent un ou des facteurs de transcription - transactivateur - pour stimuler l'expression de leurs programmes génétiques. On peut citer en exemple les protéines E2 du virus du

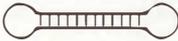
	Oligonucléotide double brin 	Oligonucléotide en haltère 
Stabilité	+ / -	+++
Fixation aux protéines (retard sur gel)	+++	+++
Spécificité de fixation	+++	+++
Inhibition de la transcription <i>in vitro</i> (extraits nucléaires)	+++	+++
Inhibition de la transcription <i>ex vivo</i> (cultures cellulaires)	+ / -	+++

Figure 3. **Comparaison des propriétés des oligonucléotides double brin linéaires et des oligonucléotides en haltères (dumbbells).**

papillome, ICP4, ICP0 et VP16 du virus *Herpes simplex*, Tax pour HTLV-I (*human T cell leukemia virus*), Tat pour VIH (virus de l'immunodéficience humaine), etc. Dans tous ces cas, l'interaction entre un transactivateur viral et sa séquence de fixation constitue une entité unique, qui offre une cible hautement spécifique pour s'attaquer à ces virus.

Facteurs de transcription et thérapeutique

La pharmacopée actuelle utilise déjà de nombreux composés qui inter-

agissent spécifiquement avec les facteurs de transcription. Ce sont principalement des hormones et des dérivés de synthèse qui interagissent avec des récepteurs nucléaires. Par exemple, le tamoxifène est un puissant antagoniste d'œstrogène utilisé comme traitement adjuvant dans les cas de cancer du sein à dépendance hormonale [22]. Le RU486 (mifépristone) est un antiprogéstatif utilisé dans le traitement des méningiomes, des endométrioses, et comme contraceptif post-coïtal [22]. Les anti-androgènes comme le flutamide et l'acétate de cyprotérone sont uti-

lisés dans le traitement des cancers de la prostate dépendants des androgènes [22]. L'acide rétinoïque, quant à lui, permet une rémission chez les malades atteints d'une leucémie promyélocytaire aiguë, et porteurs de la translocation affectant le récepteur α de l'acide rétinoïque que nous avons décrite ci-dessus [21].

Dans tous ces cas, ces molécules agissent en se liant au domaine de fixation de l'hormone sur le récepteur nucléaire. Ces composés n'inhibent généralement pas la fixation de ces récepteurs sur l'ADN. L'intérêt d'une approche sens, dans ces différents cas, est qu'elle permettrait de neutraliser les effets d'un récepteur en bloquant directement sa fixation à l'ADN. Les oligonucléotides sens sont en fait des antagonistes très naturels de tous ces facteurs. Les approches développées actuellement contre des facteurs de transcription ne sont cependant pas toutes couronnées de succès. On peut citer le cas du Ro-24-7429, qui est une benzodiazépine développée comme inhibiteur spécifique de *TAT* du VIH. Le Ro-24-7429, qui est capable d'inhiber de façon très efficace la réplication du VIH *in vitro*, s'est révélée inefficace lors d'essais cliniques [23]. On ne sait pas si cette inefficacité résulte d'un problème pharmacologique ou de mécanismes biologiques permettant au virus d'utiliser des systèmes alternatifs à *TAT* pour son expression *in vivo*.

Dans des analyses expérimentales exploratoires, des oligonucléotides antisens ont déjà été dirigés avec succès contre des ARN messagers codant pour des facteurs de transcription afin d'en réduire l'expression. Par exemple, chez la souris, l'injection d'oligonucléotides antisens dirigés contre NF κ B fait régresser des tumeurs induites par HTLV-I [24] ou par des cellules tumorigènes K-BALB ou B-16 [25]. Chez le rat, des oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARN messenger du facteur de transcription Myb permettent d'éviter le développement de resténoses post-angioplastiques [26]. Chez la souris, à nouveau, des oligonucléotides antisens dirigés contre *N-myc*, injectés localement dans une

tumeur neuroectodermique greffée, en inhibent le développement [27].

Quel type d'oligonucléotides comme ligands compétitifs ?

Pour développer des oligonucléotides de type sens dans un but d'application pharmacologique, plusieurs critères doivent être remplis *a priori*. En particulier, ces oligonucléotides doivent être stables dans l'environnement cellulaire et extracellulaire, et reconnus par les facteurs ciblés avec une grande affinité et une grande spécificité. Dans le cadre de l'approche sens, les oligonucléotides phosphodiester sont des candidats naturels qui offrent de grands avantages, en terme d'affinité, de spécificité, de non-toxicité, mais qui présentent le désavantage d'être relativement instables et sensibles aux attaques nucléasiques.

Dans le cadre des approches antisens, de nombreuses modifications chimiques des nucléotides et des liaisons internucléotidiques ont été développées afin d'obtenir des oligonucléotides résistants aux nucléases mais conservant des propriétés d'appariement à leurs cibles [1]. On sait en effet que les oligonucléotides sont dégradés, principalement par des exonucléases 3' dans les cellules et dans le sérum [28]. Bien que les oligonucléotides bicaténaires utilisés dans l'approche sens soient plus stables que les molécules simple brin utilisées dans les approches antisens classiques, ils sont néanmoins sensibles aux nucléases [29].

Les expériences réalisées pour étudier l'inhibition par les oligonucléotides HNFI ont montré que les molécules bicaténaires linéaires n'étaient pas suffisamment efficaces pour exercer des effets inhibiteurs *ex vivo*, dans des cellules en culture [17]. *In vitro*, les molécules en haltères (*dumbbells*) et les molécules linéaires présentent les mêmes propriétés d'affinité, de sélectivité, et d'inhibition de la transcription (*figure 3* et [17]). En revanche, *ex vivo*, seules les molécules en haltères exercent cette inhibition (*figure 2*). Les oligonucléotides étant introduits dans la cellule par trans-

fection, on ne peut pas incriminer une différence de pénétration pour expliquer ces effets différents, et il semble que la stabilité très supérieure des molécules en haltères soit le facteur déterminant.

Les molécules en haltères sont beaucoup plus stables que les molécules bicaténaires linéaires [29, 30]. Par définition, les molécules en haltères sont des molécules circulaires et ne présentent donc pas d'extrémité libre, ce qui les rend résistantes aux exonucléases. De façon surprenante, elles sont également résistantes aux endonucléases [17]. Cela peut s'expliquer par une plus grande stabilité de la structure bicaténare qui est confirmée par une température moyenne de fusion plus élevée pour une molécule en haltères que pour une molécule linéaire. Les températures de fusion d'une molécule en haltères, ADN ou même ARN, sont de 25 °C à 40 °C supérieure à celles de la même molécule mais linéaire [30]. Cette structure pourrait présenter une organisation spatiale plus compacte, qui, sans réduire l'affinité pour un facteur de transcription, protégerait au moins partiellement contre la dégradation par des endonucléases. Pour obtenir des structures encore plus résistantes, il est possible d'utiliser des liens non oligonucléotidiques pour refermer la molécule à chaque extrémité. Stables, présentant une excellente affinité et une grande sélectivité pour les facteurs de transcription, efficaces *ex vivo*, les oligonucléotides en haltères semblent être de bons candidats comme agents exogènes de régulation de la transcription. De telles molécules peuvent être encore améliorées, par exemple en introduisant des groupements chimiques réactifs capables de réaliser des pontages covalents entre le ligand et sa cible. Cette stratégie a été décrite indépendamment par les groupes de Orgel et Shabarova, qui ont montré qu'il était ainsi possible de piéger des protéines purifiées telles que les facteurs de transcription CREB (*cAMP response element-binding protein*) et Jun [31] ou les enzymes de restriction EcoRI et RsrI [32].

Comme pour l'approche antisens, l'obtention de ligands de type sens pour les facteurs de transcription est

RÉFÉRENCES

23. Roche. HIV Tat antagonist fails to show efficacy. *Antivir Ag Bull* 1993; 6: 162-3.
24. Kitajima I, Shinohara T, Bilakovics J, Brown DA, Xu X, Nerenberg M. Ablation of transplanted HTLV-1 Tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF-kB. *Science* 1992; 258: 1792-5.
25. Higgins KA, Perez JR, Coleman TA, Dorshkind K, McComas WA, Sarmiento UM, Rosen CA, Narayanan R. Antisense inhibition of the p65 subunit of NF-kB blocks tumorigenicity and causes tumor regression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9901-5.
26. Simons M, Edelman ER, DeKeyser JL, Langer R, Rosenberg RD. Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation *in vivo*. *Nature* 1992; 359: 67-70.
27. Whitesell I, Rosolen A, Neckers LM. *In vivo* modulation of *N-myc* expression by continuous perfusion with an antisense oligonucleotide. *Antisense Res Dev* 1991; 1: 343-50.
28. Eder PS, DeVine RJ, Dagle JM, Walder JA. Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma. *Antisense Res Dev* 1991; 1: 141-51.
29. Chu BCF, Orgel IE. The stability of different forms of double-stranded decoy DNA in serum and nuclear extracts. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 5857-8.
30. Ma MYX, McCallum K, Climie SC, Kuperman R, Lin WC, Sumner-Smith M, Barnett RW. Design and synthesis of RNA miniduplexes *via* a synthetic linker approach. 2. Generation of covalently closed, double-stranded cyclic HIV-1 TAR RNA analogs with high Tat-binding affinity. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 2585-9.
31. Chu BCF, Orgel IE. Crosslinking transcription factors to their recognition sequences with Pt II complexes. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 2497-502.
32. Purmal AA, Shabarova ZA, Gumpert RI. A new affinity reagent for the site-specific, covalent attachment of DNA to active-site nucleophiles: application to the EcoRI and RsrI restriction and modification enzymes. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 3713-9.

fondée sur la nature de la séquence de l'ADN reconnue par le facteur. En revanche, par des processus de sélection itérative, il est possible de trouver des séquences présentant des affinités beaucoup plus importantes que les séquences naturelles, et donc d'adapter le type de molécule sens à la situation particulière visée. Des techniques de sélection à partir de séquences aléatoires permettent également de rechercher des séquences de fixation optimales pour des facteurs dont on ignore la nature des cibles. La possibilité de trouver la séquence de fixation optimale pour un facteur dont on ne connaît rien est un avantage considérable dans le cas des récepteurs nouveaux, « orphelins » (c'est-à-dire dont on ignore le ligand naturel), pour lesquels il est difficile, *a priori*, de développer des antagonistes rationnels.

Depuis plusieurs années, d'importants efforts ont été consentis pour approfondir les technologies basées sur les oligonucléotides de synthèse, dans le but de développer de nouveaux outils thérapeutiques afin de lutter de façon spécifique contre des infections virales ou des maladies tumorales. Une grande partie des recherches sur les stratégies antisens entrent à présent dans une phase de développement pharmacologique et plusieurs essais cliniques sont en cours. Toutes les avancées technologiques développées ces dernières années dans le domaine des oligonucléotides antisens, que ce soit pour la chimie de synthèse à grande échelle, la vectorisation ou la galénique, pourront bénéficier aux approches sens et leur permettre de progresser rapidement vers des essais et des applications thérapeutiques ■

Summary

Sense oligonucleotides : rational ligands for transcription factors

Transcriptional control in eukaryotes results from the interplay between *cis*-acting DNA sequences in promoters, enhancers or silencers and *trans*-acting regulatory proteins (transcription factors). Transcription factors exhibit a great diversity, strong affinity and high specificity for their binding sites on DNA, and their effects on gene expression are very specific. Moreover, transcription factors are implicated in the development of numerous human diseases. These features make them attractive targets for therapeutic research. One possible approach to decrease the availability of a DNA-binding transcription factor, and thereby inhibit or activate the expression of a specific gene, is to titrate the targeted protein with a double-stranded oligonucleotide containing its specific DNA binding site. This oligonucleotide-based sense strategy may thus provide a rational therapeutic tool to control genes, the expression of which is specifically involved in viral diseases or cancer. Dumbbell oligonucleotides are closed molecules in which the double-stranded binding sequence is connected at both ends by loops. Dumbbells combine proper binding of transcription factors together with an increased stability towards nuclease degradation. Nanomolar concentrations of these substances have been shown to strongly inhibit gene expression with high specificity in *ex vivo* assays. These properties make them particularly attractive as transcription factor « traps ». Dumbbell oligonucleotides offer a new and efficient approach for the exogenous control of gene expression.

TIRÉS A PART

M. Vasseur.