

Un oligonucléotide antisens corrige une mutation thalassémique dans la cellule

Parmi plus de 150 défauts moléculaires décrits à l'heure actuelle comme responsables d'un phénotype thalassémique, le quart sont des erreurs d'épissage de l'ARN: mutations des sites d'épissage eux-mêmes ou de leur voisinage immédiat. L'activation de sites cryptiques, éliminant plus ou moins l'utilisation des sites normaux, est classique également. Un mécanisme complexe est le résultat d'une mutation fréquente en Asie: la création d'un site donneur 5' au milieu du deuxième intron (C → T en position 654) s'accompagne de l'utilisation d'un site cryptique accepteur 3' en position 580, d'où la création d'un exon supplémentaire et le décalage de la phase de lecture qui aboutit à un ARN non traduisible (figure 1). Les sites d'épissage normaux étant respectés, l'hypothèse a été faite que le blocage des sites aberrants devrait rétablir un épissage normal. C'est ce que vient de démontrer une équipe américaine en corrigeant ce défaut thalassémique par un oligonucléotide antisens [1] (*University of North Carolina, Chapel Hill, NC et Hybridon Inc, Worcester, MA, USA*). Le travail a été effectué sur des cellules HeLa et NIH 3T3 transfectées avec un plasmide contenant la mutation thalassémique. Un 18-mer méthylé (phosphorothioate 2'-O-méthyl-oligo-ribo-nucléotide) ciblé sur le site 5' muté a été introduit dans les cellules à des doses croissantes en utilisant comme vecteur un liposome cationique (lipofectamine); les ARN ont été analysés après transcription inverse et PCR (RT-PCR) à des temps variables de 6 à 96 heures, et la synthèse protéique parallèlement contrôlée par immuno-électrophorèse. La proportion d'ARN correctement épissés augmente jusqu'à 34% lorsque la concentration d'oligonu-

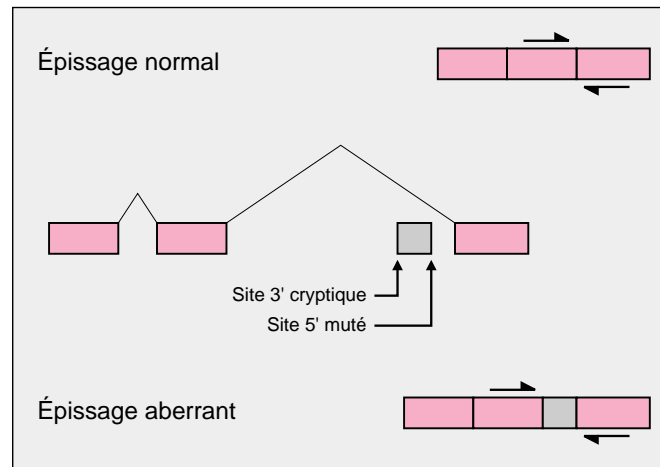


Figure 1. **Schéma de la mutation C → T en position 654 du deuxième intron.** En traits pleins, l'épissage d'un gène normal; en traits discontinus l'épissage du gène muté, qui a créé un exon supplémentaire et n'est, de ce fait, pas traduisible, car il n'est plus en phase avec le troisième exon. La RT-PCR est pratiquée en utilisant des amorces situées dans l'exon 2 et l'exon 3, qui sont figurées par des flèches; les fragments obtenus ont évidemment des tailles différentes.

cléotide augmente de 0,05 à 0,2 μM , se stabilise puis s'annule à 0,6 μM ; la présence de l'ARN normalement épissé s'accompagne d'une synthèse de globine normale. Un résultat voisin, quoique de plus faible intensité est obtenu avec la même approche ciblée sur le site cryptique 3' utilisé de façon aberrante. La spécificité de séquence parfaite de l'oligonucléotide a été vérifiée avec de nombreux oligonucléotides de contrôle; on n'a observé, par ailleurs, aucun effet non spécifique au niveau cellulaire. L'originalité du travail repose ici sur le fait qu'un oligonucléotide antisens, dont l'usage habituel est d'inhiber l'expression d'un gène cible, est utilisé pour restaurer une expression

normale dont les conditions sous-jacentes existent. Il reste maintenant à envisager les multiples développements permettant d'appliquer cette méthode au traitement de cellules hématopoïétiques chez des sujets thalassémiques, mais aussi à d'autres défauts d'épissage. N'oublions pas, cependant, devant cette prouesse technique, que la piètre biodisponibilité actuelle des oligonucléotides interdit de voir là une voie thérapeutique de la thalassémie dans un avenir proche.

D.L.

1. Sierakowska H, Sambade MJ, Agrawal S, Kole R. Repair of thalassemic human β -globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12840-1.