



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1**

**2009**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**L'ARN INTERFERENCE,  
L'EMERGENCE D'UNE NOUVELLE  
STRATEGIE THERAPEUTIQUE**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement

Le 5 juin 2009

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **Gaëlle CREUSAT**  
née le 19 décembre 1979 à Nancy (54)

**Membres du Jury**

Président : Mme Chantal FINANCE, Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy

Juges : M. Jean-Serge REMY, Directeur de recherche, CNRS UMR 7199, Strasbourg  
M. Raphaël DUVAL, Maître de conférences, Faculté de Pharmacie, Nancy

**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1**

**2009**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**L'ARN INTERFERENCE,  
L'EMERGENCE D'UNE NOUVELLE  
STRATEGIE THERAPEUTIQUE**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement

Le 5 juin 2009

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **Gaëlle CREUSAT**  
née le 19 décembre 1979 à Nancy (54)

**Membres du Jury**

Président : Mme Chantal FINANCE, Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy

Juges : M. Jean-Serge REMY, Directeur de recherche, CNRS UMR 7199, Strasbourg  
M. Raphaël DUVAL, Maître de conférences, Faculté de Pharmacie, Nancy

UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1  
FACULTE DE PHARMACIE

**DOYEN**

Chantal FINANCE

**Vice-Doyen**

Francine PAULUS

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Pierre LABRUDE

**Responsable de la Commission de la Recherche**

Jean-Claude BLOCK

**Directeur des Etudes**

Gérald CATAU

**Responsable de la Commission des Relations Internationales**

Janine SCHWARTZBROD

**Responsable de la Communication**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la Commission Hygiène Sécurité**

Laurent DIEZ

**Responsable de la filière Officine :**

Gérald CATAU

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du CEPH :**

(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Jean-Michel SIMON

**Doyen Honoraire :** Claude VIGNERON

**Professeur Emérite :** Gérard SIEST

**Professeurs Honoraires**

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMAN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Louis SCHWARTZBROD

**Maîtres de Conférences Honoraires**

Marie-Claude FUZELLIER

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**Assistante Honoraire**

Madame BERTHE

## ENSEIGNANTS

### PROFESSEURS

Alain ASTIER (en disponibilité) .....	Pharmacie clinique
Jeffrey ATKINSON .....	Pharmacologie
Gilles AULAGNER .....	Pharmacie clinique
Alain BAGREL .....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK .....	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE .....	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL .....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Marie-Madeleine GALTEAU .....	Biochimie clinique
Christophe GANTZER .....	Microbiologie environnementale
Max HENRY .....	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU .....	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE .....	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Dominique LAURAIN-MATTAR.....	Pharmacognosie
Isabelle LARTAUD.....	Pharmacologie
Pierre LEROY.....	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT.....	Pharmacie galénique
Alain MARSURA.....	Chimie thérapeutique
Jean-Louis MERLIN.....	Biologie cellulaire oncologique
Alain NICOLAS.....	Chimie analytique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS.....	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN.....	Biochimie, Biologie moléculaire
Janine SCHWARTZBROD .....	Bactériologie, Parasitologie
Jean-Michel SIMON.....	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Claude VIGNERON.....	Hématologie, Physiologie

### MAITRES DE CONFERENCES

Monique ALBERT.....	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS.....	Parasitologie
Mariette BEAUD.....	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT.....	Communication et Santé
Michel BOISBRUN.....	Chimie thérapeutique
Catherine BOITEUX.....	Biophysique, Audioprothèse
François BONNEAUX.....	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA.....	Physiologie
Gérald CATAU.....	Pharmacologie
Jean-Claude CHEVIN.....	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT.....	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB.....	Parasitologie, Organisation animale
Joël COULON.....	Biochimie
Sébastien DADE.....	Bio-informatique
Bernard DANGIEN.....	Botanique, Mycologie
Dominique DECOLIN.....	Chimie analytique
Béatrice DEMORE.....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU.....	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Florence DUMARCAY.....	Chimie thérapeutique

François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL.....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE.....	Hématologie
Luc FERRARI.....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD.....	Pharmacie clinique
Françoise HINZELIN.....	Mycologie, Botanique
Thierry HUMBERT.....	Chimie organique
Frédéric JORAND.....	Santé et Environnement
Francine KEDZIEREWICZ.....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT.....	Informatique, Biostatistiques
Brigitte LEININGER-MULLER.....	Biochimie
Stéphanie MARCHAND.....	Chimie physique
Faten MEHRI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Patrick MENU.....	Physiologie
Christophe MERLIN.....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU.....	Pharmacognosie
Dominique NOTTER.....	Biologie cellulaire
Francine PAULUS.....	Informatique
Christine PERDICAKIS.....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO.....	Pharmacologie
Virginie PICHON.....	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER.....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY.....	Santé publique
Gabriel TROCKLE.....	Pharmacologie
Mohamed ZAIYOU.....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI.....	Pharmacie galénique

### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER..... Sémiologie

### **PROFESSEUR AGREGE**

Christophe COCHAUD..... Anglais

### **ASSISTANT**

Annie PAVIS..... Bactériologie

### **SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITE (SCD)**

Anne-Pascale PARRET..... Directeur

Frédérique FERON..... Responsable de section Pharmacie-Odontologie

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**De honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**De exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX  
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES  
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES  
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Je remercie le Professeur Chantal Finance pour la qualité et la richesse de son enseignement durant nos études, et pour avoir accepté aussi naturellement de présider mon jury de thèse malgré un emploi du temps surchargé.

Je remercie le Docteur Jean-Serge Remy, qui en plus d'avoir été mon directeur de thèse de recherche durant 3 ans, a également accepté de faire partie de mon jury de thèse d'exercice (quitte à devoir venir faire un petit tour en Lorraine ;) !).

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Raphaël Duval qui a si spontanément accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie Jérôme P., Delphine, Isa, Max, et les autres membres de notre petit groupe pour les 5 années formidables que nous avons passées sur les bancs de la fac de pharma. Merci pour leur bonne humeur, leur humour, leur soutien, leur originalité quelquefois excentrique, et pour tout ce que j'ai eu (ou aurai) l'occasion de partager avec eux. Leur amitié m'est très précieuse, et les moments privilégiés que nous avons partagés resteront inoubliables.

Je remercie également toutes les personnes rencontrées durant ma thèse de recherche à Strasbourg. Chacun, à sa manière, m'a beaucoup apporté. Merci à Jérôme K., Jean-Seb, Marion, Emilie V., Clément, Nasser, Rkia, Béné, Stéphane, Guy, Thomas, Etienne, Mathieu et Nico.

Je souhaite remercier tous mes amis de longue date, qui parviennent malgré tout à me supporter dans la vie de tous les jours depuis plusieurs années. Merci à Caro, Christelle, Cathou, Fanny, Axelle, Benoît, Carole, Emilie, Isa, et tous ceux que je n'ai pas cités nommément. Merci pour votre amitié, votre soutien, votre présence et la richesse des moments que nous partageons.

Et enfin, je remercie mes parents, mon frère et sa petite famille, mais aussi les membres de ma famille et toutes les personnes de mon entourage, pour leurs valeurs, leurs encouragements et leur soutien inconditionnel durant mon long périple d'étudiante.

<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE 1</b>	
<b>DECOUVERTE DE L'ARN INTERFERENCE .....</b>	<b>9</b>
<b>I. STRATEGIES D'EXTINCTION DE L'EXPRESSION DES GENES.....</b>	<b>11</b>
A) Ciblage de l'ADN.....	12
1- Triples hélices.....	12
2- Invasion de brin.....	12
B) Ciblage de l'ARN messenger.....	13
1- Stratégie ribozyme.....	13
2- Stratégie ARN antisens.....	13
3- Stratégie ADN antisens.....	14
<b>II. DECOUVERTE DE L'ARN INTERFERENCE.....</b>	<b>14</b>
<b>III. ROLE DE L'ARN INTERFERENCE.....</b>	<b>16</b>
<b>CHAPITRE 2</b>	
<b>MECANISME DE L'ARN INTERFERENCE .....</b>	<b>19</b>
<b>I. EXTINCTION POST-TRANSCRIPTIONNELLE.....</b>	<b>21</b>
A) Cas des siRNA.....	22
B) Cas des miRNA.....	24
C) Amplification de l'extinction.....	25
D) Propagation de l'extinction.....	26
<b>II. EXTINCTION TRANSCRIPTIONNELLE.....</b>	<b>27</b>
A) Formation d'hétérochromatine.....	27
B) Méthylation de l'ADN.....	29
<b>CHAPITRE 3</b>	
<b>APPLICATIONS DE L'ARN INTERFERENCE.....</b>	<b>31</b>
<b>I. OUTIL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>33</b>
<b>II. OUTIL POUR VALIDER DES CIBLES THERAPEUTIQUES.....</b>	<b>33</b>
<b>III. APPLICATIONS EN THERAPEUTIQUE.....</b>	<b>34</b>
A) Maladies virales.....	34
B) VIH.....	35
C) Cancers.....	35
D) Autres maladies.....	36

<b>CHAPITRE 4</b>	
<b>MISE EN OEUVRE DE L'ARN INTERFERENCE.....</b>	<b>37</b>
<b>I. CHOIX DU DECLENCHEUR. ....</b>	<b>39</b>
A) Expression endogène de siRNA ou shRNA.....	39
B) Expression exogène d'ARN interférents.....	41
<b>II. CONCEPTION DES SIRNA.....</b>	<b>43</b>
<b>III. OBSTACLES A LA TRANSFECTION DE SIRNA. ....</b>	<b>45</b>
A) Stabilité. ....	45
B) Pharmacocinétique et biodistribution.....	46
C) Internalisation cellulaire.....	47
D) Effets indésirables.....	47
<b>IV. MODES D'ADMINISTRATION <i>IN VIVO</i>. ....</b>	<b>48</b>
<b>CHAPITRE 5</b>	
<b>METHODES DE TRANSFECTION .....</b>	<b>51</b>
<b>I. MODIFICATIONS CHIMIQUES. ....</b>	<b>53</b>
<b>II. METHODES PHYSIQUES. ....</b>	<b>56</b>
A) Electroporation. ....	56
B) Injection hydrodynamique.....	57
C) Ultrasons.....	58
D) Bombardement de particules. ....	58
E) Microinjection. ....	58
<b>III. METHODES VIRALES.....</b>	<b>59</b>
A) Rétrovirus.....	60
B) Lentivirus.....	61
C) Adénovirus.....	61
D) Virus associé à l'adénovirus (AAV). ....	63
E) Baculovirus. ....	63
<b>IV. METHODES NON VIRALES. ....</b>	<b>63</b>
A) Conjugaison. ....	64
1- Groupements lipophiles. ....	64
2- Aptamères.....	65
B) Vecteurs cationiques. ....	66
1- Généralités.....	66
a) Caractéristiques principales.....	66

b) Internalisation cellulaire.....	67
c) Ligands d'aide à la transfection.....	68
c1. Amélioration des propriétés pharmacocinétiques.....	69
c2. Ciblage cellulaire.....	69
c3. Sortie des endosomes.....	70
2- Systèmes lipidiques.....	71
a) Liposomes.....	71
b) Lipides cationiques.....	72
3- Polymères cationiques.....	73
a) PEI.....	73
b) Dendrimères.....	75
c) Autres polymères.....	76
c1. Protamine.....	76
c2. Atélocollagène.....	76
c3. Chitosan.....	76
c4. Cyclodextrine.....	77
4- Peptides cationiques.....	77
<b>V. RECAPITULATIF.....</b>	<b>78</b>
<b>CHAPITRE 6</b>	
<b>ESSAIS CLINIQUES.....</b>	<b>79</b>
<b>I. GENERALITES.....</b>	<b>81</b>
A) Phases d'essais cliniques.....	81
B) L'essor de l'ARN interférence.....	83
<b>II. TRAITEMENT DES PATHOLOGIES OCULAIRES.....</b>	<b>84</b>
A) Pathologies.....	84
1- Dégénérescence maculaire liée à l'âge.....	84
a) Epidémiologie.....	85
b) Physiopathologie.....	85
c) Clinique.....	87
d) Diagnostic.....	87
e) Traitement.....	88
2- Œdème maculaire du diabétique.....	88
a) Epidémiologie.....	89
b) Physiopathologie et clinique.....	89
c) Traitement.....	89
B) Molécules en phase d'essai.....	90
1- Cand 5 (bevasiranib).....	90
2- Sirna 027.....	91
3- RTP801-i-14.....	91

<b>III. TRAITEMENT DES INFECTIONS VIRALES.....</b>	<b>92</b>
A) Virus respiratoire syncytial.....	92
1- Pathologie à VRS. ....	93
a) Epidémiologie. ....	93
b) Physiopathologie.....	93
c) Clinique. ....	94
d) Diagnostic. ....	94
e) Traitement. ....	94
2- Molécule en essai : ALN-RSV01. ....	94
B) Hépatite C. ....	95
1- Description. ....	95
a) Epidémiologie. ....	96
b) Clinique. ....	96
c) Diagnostic.....	97
d) Traitement. ....	98
2- Molécules en essai.....	98
C) Hépatite B. ....	99
1- Description. ....	99
a) Epidémiologie. ....	99
b) Clinique. ....	100
c) Diagnostic.....	101
d) Traitement. ....	101
2- Molécule en essai : NucB-1000.....	102
<b>IV. TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIVERSES.....</b>	<b>103</b>
A) Lymphome associé au VIH.....	103
B) Insuffisance rénale. ....	104
C) Pachyonichie congénitale.....	105
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>107</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>111</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>115</b>

## *Abréviations*

AAV	Adenovirus Associated Virus = virus associé à l'adénovirus
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN = RNA	Acide RiboNucléique = RiboNucleic Acid
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
COBALT	Combining Bevasiranib And Lucentis Therapy
CPP	Cell-Penetrating Peptide = peptide de pénétration cellulaire
Da	dalton
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
dsRNA	double-stranded RNA = ARN double brin
EAIV	Equine Anemia Infectious Virus
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
HSPG	héparanes sulfates protéoglycanes
IFN	interféron
IL	InterLeukine
IV	IntraVeineuse
KO	Knock-Out
LNA	Locked-Nucleic Acid
LPS	LipoPolySaccharide
miRNA	micro-RNA
miRNP	RiboNucléoProtéine des miRNA
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMAM	PolyAMidoAMine
PCR	Polymerase Chain Reaction
pre-miRNA	précurseurs de miRNA
pri-miRNA	miRNA primaires
PSMA	Prostate-Specific Membrane Antigen
PTGS	Post-Transcriptional Gene Silencing
RGD	peptide arginine-glycine-acide aspartique
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RITS	RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase = ARN polymerase ARN-dépendante
shRNA	short-hairpin RNA
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
siRNA	small interfering RNA
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique

TGS	Transcriptional Gene Silencing
TLR	Toll Like Receptor
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIGS	Virus-Induced Silencing Complex
VIH	Virus d'Immunodéficience Humaine
VRS	Virus Respiratoire Syncytial

# *Introduction générale*

En 2006, le Prix Nobel de Physiologie et de Médecine a été décerné à Andrew Fire et Craig Mello, pour leur mise en évidence du mécanisme d'ARN interférence. Depuis 1998, cette découverte a suscité un véritable engouement au sein de la communauté scientifique.

Grâce à l'introduction d'ARN double brin dans les cellules, il est possible d'inhiber sélectivement l'expression des gènes, à un niveau post-transcriptionnel. Ce mécanisme met notamment en jeu de petits ARN double brin, dénommés siRNA, qui vont s'associer à un complexe enzymatique afin de dégrader l'ARN messager de séquence complémentaire. Ce mécanisme, ancien mais très conservé chez les eucaryotes, serait un système de défense et de maintien de l'intégrité du génome, permettant de lutter contre les infections virales ou les transposons.

L'ARN interférence représente une méthode de premier ordre pour étudier la fonction des gènes, valider de potentielles cibles thérapeutiques et même développer de nouvelles thérapeutiques, par exemple dans les domaines de l'oncologie ou de la virologie.

Compte tenu du caractère naturel de ce mécanisme, il s'avère très efficace pour inhiber l'expression des gènes, bien plus efficace que les outils précédemment développés, tels que les stratégies antigène ou antisens. Afin de mettre en œuvre le processus d'ARN interférence dans les cellules, il est possible de recourir, soit à des vecteurs plasmidiques exprimant des ARN double brin, soit directement à des ARN interférents. Dans le premier cas, on retrouve les inconvénients de la thérapie génique, à savoir vectorisation de l'ADN jusque dans le noyau. La seconde option est souvent privilégiée puisque les siRNA ne nécessitent une délivrance que jusqu'au niveau du cytosol, leur lieu d'action.

Malgré tout, ce problème de délivrance reste un obstacle majeur à l'utilisation courante de l'ARNi. Pour des applications thérapeutiques chez l'Homme, on rencontre des problèmes de stabilité, de biodistribution, de ciblage, de pénétration cellulaire des siRNA, ou d'induction d'éventuels effets secondaires, notamment d'ordre immunologique. Tout cela implique le recours à des systèmes de transfection pour favoriser principalement la pénétration cellulaire des acides nucléiques.

L'intérêt suscité par le mécanisme d'ARN interférence et les efforts de recherche des scientifiques ont d'ores et déjà permis de développer des thérapeutiques aujourd'hui évaluées sur l'Homme dans des essais cliniques.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous reviendrons sur les circonstances de la découverte du phénomène d'ARN interférence, un mécanisme naturellement présent dans les cellules eucaryotes, et qui a complètement révolutionné le domaine de l'inhibition spécifique de l'expression des gènes.

Le mécanisme cellulaire de l'ARN interférence et les différents éléments impliqués, bien que l'on n'en connaisse pas encore tous les tenants et aboutissants, seront détaillés dans le deuxième chapitre.

Le troisième chapitre, quant à lui, sera consacré aux différentes applications possibles du mécanisme de l'ARN interférence. On retrouve ainsi son utilisation soit en tant qu'outil biologique pour la recherche fondamentale, soit en tant que technologie permettant le développement de thérapeutiques.

Dans le quatrième chapitre, nous développerons les aspects pratiques de la mise en œuvre de l'ARN interférence au niveau cellulaire. En effet, plusieurs paramètres rentrent en ligne de compte, que ce soit au niveau du choix de l'élément déclencheur de l'inhibition de l'expression des gènes, ou au niveau des conditions idéales à utiliser afin de contourner les différents obstacles existants et obtenir le résultat escompté.

Le principal problème dans le domaine de l'ARN interférence est de parvenir à mettre au point des systèmes de transfection efficaces pour améliorer la stabilité, la biodistribution et la pénétration cellulaire des acides nucléiques. Nous détaillerons ainsi, dans le cinquième chapitre, les différentes méthodes de transfection à disposition, qu'il s'agisse de méthodes physiques, virales ou non virales.

Le sixième et dernier chapitre de ce manuscrit récapitulera les principaux essais cliniques en cours dans le domaine de l'inhibition spécifique de l'expression des gènes basée sur l'ARN interférence. Les thérapeutiques les plus avancées dans les phases d'essai clinique concernent le traitement de pathologies oculaires comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou l'œdème maculaire. Les autres thérapeutiques en cours d'évaluation chez l'Homme sont utilisées pour le traitement de différentes infections virales, qu'il s'agisse d'infections respiratoires ou hépatiques, pour lesquelles l'organe cible est facilement accessible.

## CHAPITRE 1

### *Découverte de l'ARN interférence*

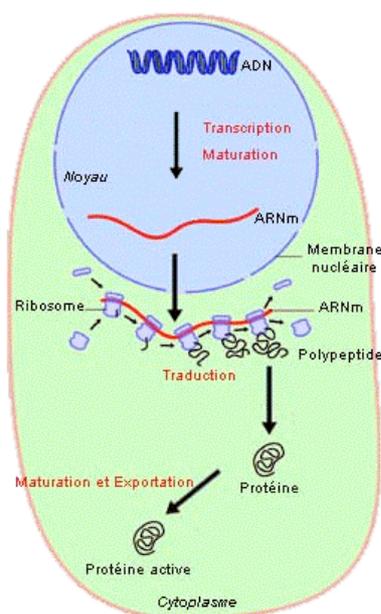
Parvenir à inhiber l'expression d'un gène impliqué dans un processus pathologique représenterait une avancée majeure dans le domaine thérapeutique. De nombreuses techniques d'inhibition ont été développées, telles que les stratégies anti-gènes ou antisens [228], mais elles s'avèrent difficiles à mettre en œuvre et encore trop faiblement efficaces.

La découverte fortuite, en 1998, d'un processus naturel d'extinction, appelé ARN interférence (ARNi), a débloqué la situation. En effet, ce mécanisme permet une inhibition séquence-spécifique de l'expression d'un gène, de façon aisée et robuste.

Ce phénomène a été identifié dans de nombreux organismes eucaryotes, allant des plantes jusqu'aux mammifères [212], suggérant la conservation de ce processus parmi les espèces invertébrées et vertébrées. Cette extinction de gène, spécifique de séquence, pourrait être un système ancestral de surveillance immunitaire [213], permettant l'inhibition de l'expression des acides nucléiques de parasites endogènes ou de pathogènes exogènes, ainsi que la régulation de l'expression des gènes.

## I. STRATEGIES D'EXTINCTION DE L'EXPRESSION DES GENES.

L'information génétique est décodée au niveau du noyau pour aboutir à la production de protéines au niveau du cytoplasme (figure 1). Afin d'inhiber l'expression des gènes, il est possible d'intervenir à différents niveaux de ce processus multi étapes.



**Figure 1 :** Etapes de la synthèse d'une protéine dans les cellules eucaryotes.

## A) Ciblage de l'ADN.

L'objectif du ciblage de l'ADN double brin du noyau est de bloquer la transcription de l'ADN en ARN messager (ARNm). Le principe est d'entraver l'action de l'enzyme impliquée, l'ARN polymérase. Il est possible d'agir à deux niveaux, soit en empêchant l'assemblage de la polymérase avec les facteurs de transcription (au niveau du site d'initiation), soit en empêchant sa progression le long de l'ADN. Ces stratégies, que l'on appelle stratégies antigènes, laissent espérer une grande efficacité d'inhibition, puisque l'on ne cible qu'une entité (l'ADN double brin), et non pas de multiples molécules (cas des ARNm). On trouve deux méthodes principales : la formation de triples hélices et l'invasion de brin.

### 1-Triples hélices.

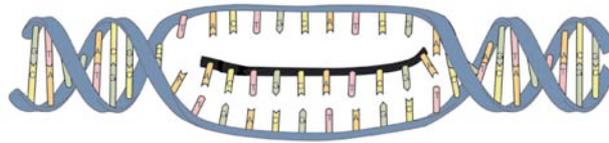
L'idée est d'utiliser des oligonucléotides capables de former des triples hélices (figure 2) pour bloquer le site d'initiation de la transcription du double brin d'ADN, les triplex n'étant pas assez stables pour bloquer l'élongation de la transcription une fois celle-ci amorcée [187]. L'oligonucléotide 3<sup>ème</sup> brin se lie dans le grand sillon de la double hélice d'ADN par des liaisons hydrogènes de type Hoogsten ou Hoogsten inverse. Ce type de liaison ne dénature pas les liaisons de Watson-Crick, mais elles ne peuvent se produire qu'au niveau des séquences homopuriques.



**Figure 2 :** Représentation de la formation d'une triple hélice entre l'ADN et un oligonucléotide.

### 2-Invasion de brin.

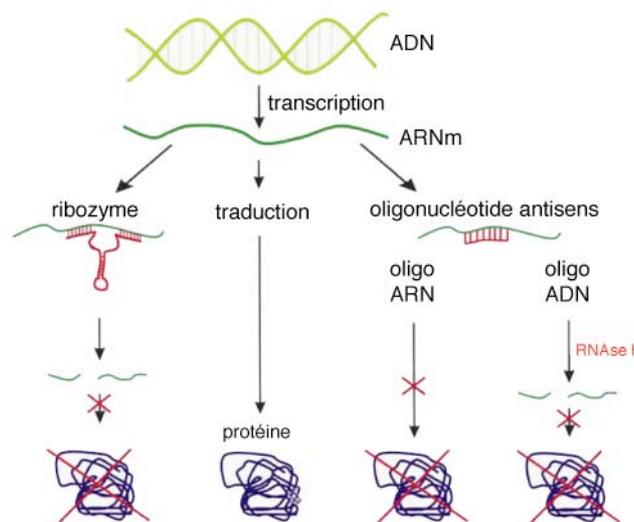
La stratégie d'invasion de brin consiste à utiliser un oligonucléotide capable de déplacer l'un des brins de l'ADN pour venir s'apparier à sa séquence complémentaire (figure 3), par des liaisons de type Watson-Crick [114]. L'invasion de brin, contrairement aux triples hélices, peut à priori être utilisée pour cibler n'importe quelle séquence (bases puriques et pyrimidiques). De plus, il est possible de cibler le site d'initiation de la transcription puisque l'assemblage de l'ARN polymérase et de ses cofacteurs induit la formation d'une structure qui contient plusieurs bases ouvertes.



**Figure 3 :** Représentation de l'invasion de brin de l'ADN par un oligonucléotide.

## B) Ciblage de l'ARN messenger.

Il existe plusieurs stratégies d'inhibition de l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle, par intervention au niveau de l'intermédiaire ARNm (figure 4).



**Figure 4 :** Stratégies d'extinction post-transcriptionnelle.

### 1-Stratégie ribozyme.

Les ribozymes sont des ARN de 40 à 160 bases qui ont une structure secondaire particulière leur conférant une activité catalytique de nature RNase [299]. Ceci passe par un alignement du site actif du ribozyme sur l'ARN cible, grâce aux séquences situées de part et d'autre qui assurent la spécificité et la liaison du ribozyme [103]. L'intérêt de l'hybridation ARN-ribozyme réside dans la survenue, au niveau du noyau catalytique de cette molécule, d'une coupure séquence-spécifique de l'ARNm.

### 2-Stratégie ARN antisens.

Des tentatives d'extinction d'expression de gènes, au niveau post-transcriptionnel, ont été réalisées à l'aide d'ARN antisens de séquence complémentaire à celle de l'ARN messenger à

bloquer [112]. Dans ce système, l'ARN simple brin, une fois introduit au niveau intracellulaire, s'hybride et forme un duplex ARN-ARN, ce qui bloque l'accès du message au système de traduction, et entraîne secondairement la dégradation de l'ARNm par des nucléases cellulaires.

### **3-Stratégie ADN antisens.**

L'objectif de cette stratégie est d'utiliser des oligonucléotides capables de s'associer spécifiquement à une séquence cible de l'ARN messager par des liaisons de Watson-Crick. L'hétéroduplex formé entre l'oligonucléotide antisens et l'ARNm perturbera la traduction de ce dernier en protéine [210]. En effet, les duplex ADN-ARN activent une ribonucléase, la RNase H, qui clive alors le brin ARN [280].

## **II. DECOUVERTE DE L'ARN INTERFERENCE.**

En 1998, Andrew Fire et Craig Mello découvrent que l'introduction d'ARN double brin dans les cellules d'un nématode, le ver *Caenorhabditis elegans*, permet de réduire spécifiquement l'expression de protéines en se liant à leur ARN messager [73]. Ce phénomène avait toutefois été observé précédemment, mais n'avait pas été identifié en tant que tel ; il a fallu de nombreuses études pour réussir à définir partiellement le mécanisme impliqué, qui n'est pas totalement élucidé à l'heure actuelle [178].

La première manifestation du phénomène d'ARN interférence a été observée en 1990 par Jorgensen et son équipe [190]. Ces biologistes en physiologie végétale voulaient intensifier la couleur des pétales de pétunias. Par transgénèse, ils ont introduit dans les plantes des copies supplémentaires du gène de la chalcone synthétase. Ils eurent la surprise de constater qu'au lieu d'obtenir la couleur pourpre attendue, certaines plantes (plus de 40%) exprimaient des fleurs blanches : non seulement le transgène ne s'était pas exprimé, mais il y avait inhibition de l'expression du gène endogène [271]. Ils observèrent également que ce phénomène était réversible puisque les fleurs retrouvaient leur pigmentation lors de la perte du transgène. A cette époque, ce phénomène fut qualifié de co-suppression.

Le même résultat a été observé chez la tomate, lorsqu'un gène de polygalacturonase, responsable du mûrissement, y a été introduit [240]. Le phénomène de co-suppression n'était donc pas spécifique au pétunia. Puis, sur des plants de tabac dans lesquels on avait introduit

un gène de  $\beta$ -1,3-glucanase, il a été mis en évidence que la co-suppression était corrélée à une diminution du taux d'ARNm correspondant dans les cellules [52].

D'autres études sur *Neurospora crassa* aboutirent également à ce type de résultats paradoxaux. L'ajout de séquences géniques supplémentaires du gène albino-1, impliqué dans la biosynthèse du carotène, aboutit à l'extinction de leur expression, puisque 30% des colonies sont albinos au lieu d'orange [223]. Les observations furent les mêmes que précédemment, à savoir que le phénomène était transitoire, les colonies se recolorant avec la perte du transgène lors de leur croissance [45], et qu'il était lié à une diminution de l'ARNm correspondant. Mais les scientifiques n'ont pas fait de lien direct avec les résultats obtenus sur les plantes, et ont défini ce qu'ils ont observé dans le règne fongique comme étant un phénomène de « quelling ».

Afin d'inhiber la fonction d'un gène chez le nématode *C. elegans*, Guo et Kempthues utilisèrent un ARN antisens [87]. Ils eurent la surprise de constater que des molécules de polarité positive étaient aussi efficaces pour inhiber l'expression du gène cible que les ARN antisens. L'explication de cette singularité fut apportée par Fire et Mello, qui mirent en évidence que c'était la formation d'ARN double brin qui en était responsable, suite à une faible quantité d'ARN antisens contaminant la préparation d'ARN sens [73]. De fait, une préparation purifiée d'ARN sens s'avérait être incapable de déclencher l'inhibition du gène correspondant. D'autre part, ils démontrèrent que cette inhibition était spécifique de l'ARNm homologue, et que l'introduction d'ARN double brin était inefficace lorsque l'on ciblait les introns de l'ARNm. Ils déduisirent donc logiquement qu'ils se trouvaient face à un phénomène d'extinction post-transcriptionnelle, qu'ils appelèrent ARN interférence.

On ne tarda pas à montrer l'implication d'ARN double brin dans la co-suppression des plantes et le quelling des champignons [33]. Puis on observa ce même mécanisme d'ARNi chez la mouche drosophile [124] et dans de nombreux autres organismes tels que *Trypanosoma brucei* [193], *Planaria* [226] ou encore *Arabidopsis thaliana* [283], ce qui donnait l'impression que ce phénomène était universel. Mais jusqu'en 2001, toutes les tentatives entreprises pour montrer l'existence de ce mécanisme dans les cellules mammifères se sont avérées infructueuses. En effet, chez les mammifères, l'introduction d'un long ARN double brin conduit à la production d'interféron [246], bloquant toute synthèse protéique, mais de façon indépendante de la séquence de l'ARN introduit. Tout a changé le jour où l'équipe de

Tuschl a montré que l'introduction de petits ARN double brin, complémentaires de l'ARNm, conduisait à la dégradation de celui-ci sans déclencher la production d'interféron [67].

En parallèle, de nombreuses équipes à travers le monde se sont penchées sur l'identification des éléments impliqués dans ce mécanisme. En 1999, Hamilton démontre la présence de petits ARN double brin, tous de même longueur et de séquence complémentaire au transgène éteint [94], qui vont être dénommés siRNA, pour small-interfering RNA. En 2001, on découvre les intermédiaires enzymatiques qui interviennent dans le processus d'extinction, le Dicer et le RISC. L'ARN interférence est toutefois un mécanisme très complexe. De nouvelles découvertes sont faites régulièrement, comme l'existence de nombreux autres petits ARN non codants [173, 248] ou de protéines. A l'heure actuelle, on ne connaît pas tous les tenants et aboutissants de ce phénomène, ce qui promet encore de nombreuses heures de travail pour les scientifiques, mais également de belles découvertes.

### **III. ROLE DE L'ARN INTERFERENCE.**

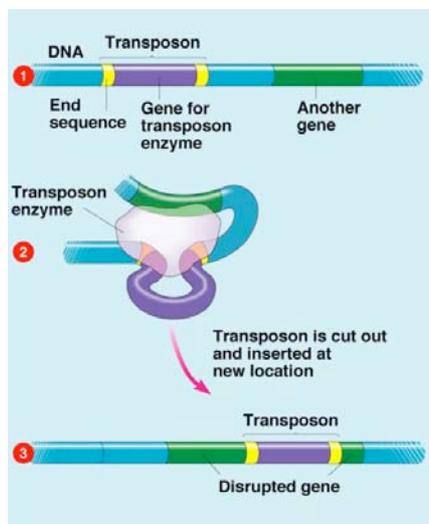
La présence d'un mécanisme d'extinction déclenché par de l'ARN double brin pose la question de l'origine et du rôle biologique de l'ARN interférence. La conservation d'un mécanisme aussi sophistiqué chez des organismes très divers n'est certainement pas une coïncidence : il pourrait s'agir d'un très ancien moyen de défense contre les virus ou les transposons [252], des parasites moléculaires qui accumulent les séquences répétées dans le génome. En effet, on ne retrouve de l'ARN double brin dans les cellules que lors des phases de réplication d'un virus ou de transposons.

Certains virus utilisent un intermédiaire d'ARN double brin lorsqu'ils infectent les cellules, et peuvent donc déclencher le mécanisme d'extinction. Ceci a été démontré dans les plantes : des transgènes de Potato Virus X et de Tobacco Etch Virus y ont été introduits afin de les rendre résistantes à ces virus. Mais cette manipulation a déclenché ce que l'on avait alors appelé VIGS (Virus-Induced Gene Silencing), une extinction qui touchait les propres éléments du virus [225].

En ce qui concerne les transposons, dans les régions du génome qui en sont riches, les deux brins sont transcrits, formant un ARN double brin qui va initier le processus d'extinction. La preuve d'une intervention de l'ARNi dans ce cas a été apportée par l'observation de

*C. elegans* mutants pour les éléments de l'ARNi, dans lesquels l'activité des transposons endogènes est considérablement augmentée [125].

L'ARN interférence serait donc un système immunitaire génomique qui permet de protéger le génome contre les virus [284] et les transposons [259], ceux-ci ayant un potentiel mutagène non négligeable, compte tenu du fait qu'ils peuvent s'intégrer aléatoirement dans le génome (figure 5). Cette dernière fonction est d'autant plus importante qu'environ 50% de notre génome est composé de séquences non codantes dérivant de transposons et d'éléments viraux qui l'ont envahi au cours de l'évolution [257].



**Figure 5 :** Schéma d'intégration aléatoire d'un transposon dans le génome.

Les plus récentes découvertes tendent à montrer que le mécanisme d'interférence pourrait aussi être utilisé par la cellule pour le contrôle de l'expression de certains gènes. Ceci se produirait notamment au cours de l'embryogenèse et du développement [2].

## CHAPITRE 2

### *Mécanisme de l'ARN interférence*

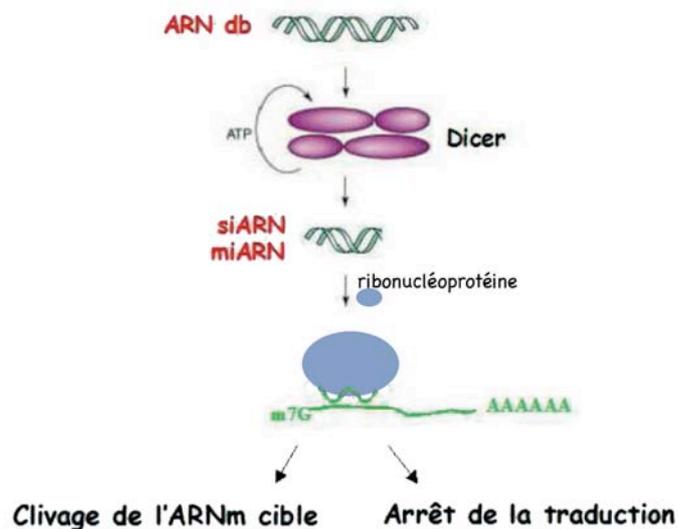
L'ARN double brin peut induire chez les eucaryotes différents processus conduisant à l'extinction de l'expression de gènes, notamment par la dégradation de l'ARN messager complémentaire. Ce phénomène d'ARN interférence passe par l'intermédiaire de petits ARN interférents, mais les composants de la machinerie d'ARNi jouent aussi un rôle dans la répression de la traduction par l'intermédiaire de microARN, dans la formation d'hétérochromatine, ou dans la méthylation de l'ADN.

L'ARN interférence contrôle ainsi l'expression génétique à deux niveaux :

- post-transcriptionnel (Post-Transcriptional Gene Silencing ; PTGS)
- transcriptionnel (Transcriptional Gene Silencing ; TGS).

## I. EXTINCTION POST-TRANSCRIPTIONNELLE.

L'extinction post-transcriptionnelle de l'expression des gènes constitue le mécanisme principal du phénomène d'ARN interférence, et se déroule en deux étapes (figure 6) qui ont lieu au niveau du cytoplasme cellulaire [123, 301].



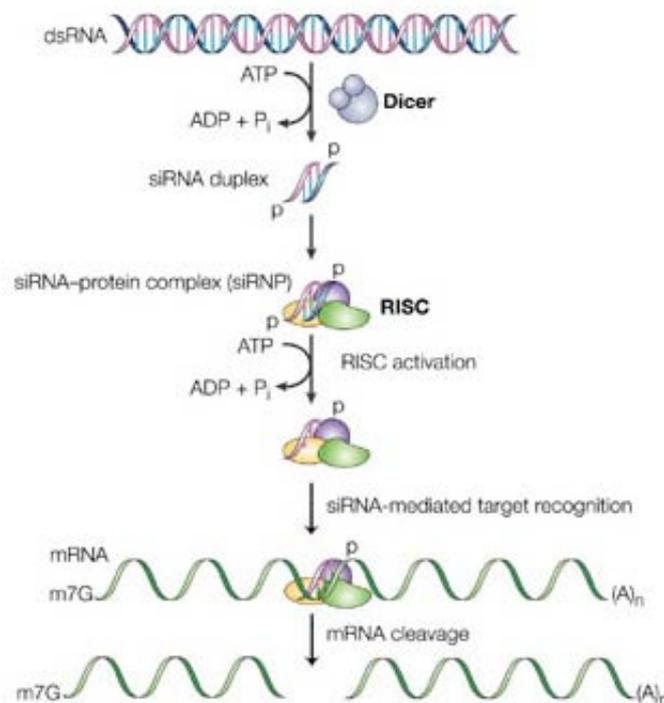
**Figure 6 :** Mécanisme général de l'extinction post-transcriptionnelle lors de l'ARN interférence.

En premier lieu, il y a reconnaissance d'un ARN double brin qui est alors dégradé en petits ARN double brin, et dans un second temps, ces derniers vont s'associer à un complexe protéique afin d'exercer leur action au niveau de l'ARN messager. On trouve deux types de petits ARN double brin selon la nature de leur précurseur : les siRNA, qui vont entraîner la dégradation de l'ARN messager, et les miRNA, qui vont inhiber la traduction. Dans certains

cas, on a observé une étape supplémentaire d'amplification de ces effets, que l'on a désignée sous le nom d'ARN interférence transitive, et également parfois une propagation de l'extinction à l'ensemble de l'organisme.

### A) Cas des siRNA.

Lorsqu'un ARN double brin est présent dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, il est pris en charge par une enzyme à activité RNase III, qui le clive en petits ARN double brin, longs de 21 nucléotides, et présentant à chaque extrémité 3' deux nucléotides non appariés, tandis qu'ils sont phosphorylés en 5' [68, 295] (figure 7).



**Figure 7 : Mécanisme d'action des siRNA.** (d'après Dykxhoorn, 2003)

Cette enzyme, majoritairement cytoplasmique et appelée Dicer, a été identifiée en 2001 par Hammond chez *Drosophila melanogaster* [27]. Il s'agit d'une ribonucléase reconnaissant spécifiquement tout ARN double brin, indépendamment de sa séquence, afin de produire de petits ARN de manière ATP dépendante [198]. De telles endonucléases ont été identifiées dans tous les organismes compétents pour l'ARN interférence [2]. Cette protéine est constituée d'un domaine ARN hélicase dans sa région N-terminale, d'un domaine PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille), de deux domaines RNase III et d'un motif de liaison de l'ARN double brin dans sa région C-terminale [168].

Des études structurales sur des RNases III bactériennes ont permis d'élaborer un modèle de fonctionnement en dimère antiparallèle pour cette enzyme [30]. Classiquement, ces enzymes possèdent quatre sites actifs. Mais dans le Dicer, un site sur deux seulement est actif, ce qui permet d'obtenir des ARN double brin de 22 nucléotides de long au lieu des petits ARN de 11 nucléotides produits habituellement par les RNases bactériennes [296].

Une fois formés, les siRNA s'associent à un complexe protéique effecteur, le RNA-Induced Silencing Complex (RISC). Il semblerait qu'il existe une protéine, R2D2, qui lie entre eux le Dicer et le complexe RISC, faisant ainsi le lien entre les deux étapes et accélérant le processus [158].

Le complexe RISC a une composition protéique variable selon les espèces [81], mais il est toujours doté d'une activité hélicase ATP-dépendante et d'une activité RNase.

Chez la drosophile, où il fut identifié [95], il est composé d'au moins quatre protéines, dont une protéine de la famille Argonaute. Les protéines argonautes sont des protéines très basiques, d'une centaine de kDa ; elles possèdent un domaine PAZ, permettant de lier de l'ARN simple brin, et un domaine Piwi, très conservé, situé à son extrémité N-terminale [41]. La plupart des organismes possèdent plusieurs gènes argonautes et le choix de la protéine argonaute contenue dans le complexe semble influencer la fonction du RISC [200]. Ainsi, Ago1 n'est trouvée que dans les RISC contenant des siRNA, provoquant donc le clivage de l'ARNm cible, alors que Ago2 n'est trouvée que dans les RISC contenant des miRNA, bloquant donc la traduction. Le complexe RISC, en plus des protéines argonautes, contient une hélicase et une nucléase, mais l'identité de ces dernières n'a pas encore été déterminée avec précision.

Les fonctions du RISC semblent nombreuses mais à ce jour, elles ne sont connues que dans les grandes lignes. Tout d'abord, ce complexe enzymatique déroule le petit ARN, de façon dépendante de l'ATP, pour dissocier les deux brins. La plus faible stabilité en 5' de l'antisens permettrait le déroulement sélectif et l'incorporation de ce brin dans le RISC [232]. Le complexe activé ne conserve que le brin antisens, qui lui sert de guide pour reconnaître l'ARNm cible [21].

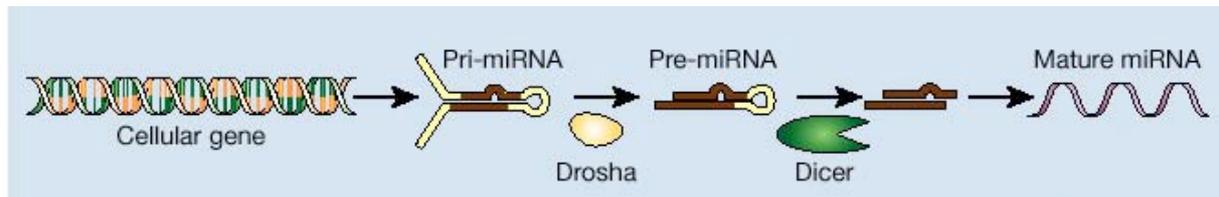
Le complexe RISC activé s'apparie à l'ARNm par l'intermédiaire des siRNA, qui ont une correspondance de séquence parfaite avec leur cible. Cela déclenche alors la dégradation de l'ARN messenger [171]. Lorsque l'ARN messenger est clivé par le complexe RISC, les fragments générés, longs d'une vingtaine de nucléotides, sont ultérieurement dégradés par des

RNases cellulaires, alors que le complexe endonucléolytique RISC est recyclé pour aller cliver d'autres ARNm [109].

## B) Cas des miRNA.

Les miRNA sont des molécules endogènes de taille identique, que l'on a identifiées, entre autres, chez les nématodes, les drosophiles, les souris et les hommes [142, 144]. Ces petits ARN sont abondamment retrouvés dans les cellules (de quelques milliers à 40 000 par cellule [153]) et ils jouent un rôle important au cours du développement. Ils sont chargés de la régulation de l'expression des gènes, et un même miRNA peut réguler jusqu'à cent gènes différents [196]. Par exemple, dans les cellules de mammifères, environ 500 miRNA ont été identifiés, qui régulent 30% des gènes [257].

Les miRNA dérivent du clivage successif de grands ARN en épingle à cheveux, encodés dans le génome et exprimés à partir d'un regroupement de gènes ou à partir d'une région unique [196].

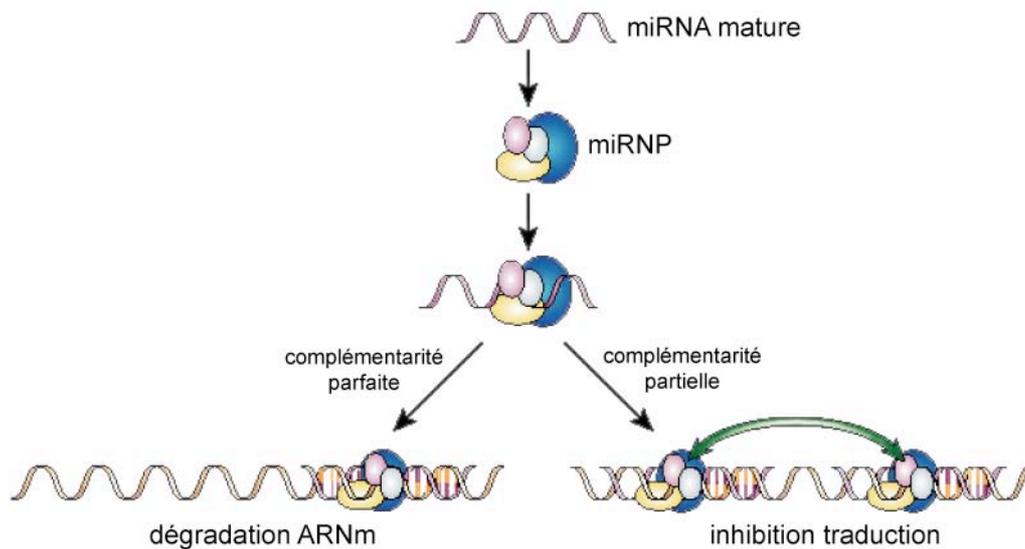


**Figure 8 :** Formation endogène des miRNA. (d'après Novina, 2004)

En premier lieu, on trouve les miRNA primaires (pri-miRNA), qui ont une complémentarité de séquence imparfaite (figure 8). A l'aide d'une enzyme appelée Drosha, ils sont clivés en plus petits ARN en épingle à cheveux de 70kb (short-hairpin RNA ; shRNA), que l'on désigne sous le nom de précurseurs de miRNA (pre-miRNA). Ces derniers sont exportés dans le cytoplasme et pris en charge par le Dicer, la même enzyme que dans le cas des siRNA. Le Dicer va couper les pre-miRNA en miRNA matures de 21-22 nucléotides, puis les dissocier en simple brin [145].

Ces miRNA simple brin s'associent en un complexe ribonucleoprotéique appelé miRNP (équivalent du RISC), et peuvent déclencher deux effets distincts selon leur complémentarité de séquence (figure 9). Les miRNA ayant une complémentarité de séquence partielle se lient à la région 3' non traduite des ARNm, ce qui a pour conséquence l'inhibition de la traduction

[99]. De nombreux complexes miRNP peuvent coopérer, par liaisons multiples dans cette région de l'ARNm, afin d'exercer une meilleure extinction [196]. Dans quelques cas, les miRNA ont une complémentarité de séquence parfaite avec l'ARNm. Le résultat obtenu est un clivage de l'ARNm [17], de façon similaire à la voie des siRNA.



**Figure 9 :** Mécanisme d'action des miRNA. (d'après Novina, 2004)

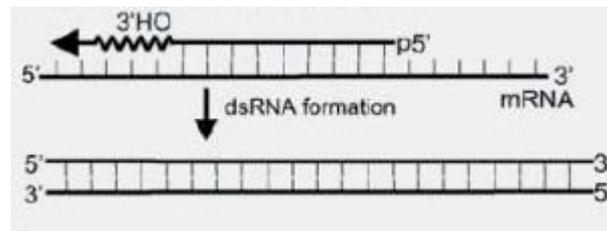
### C) Amplification de l'extinction.

Le phénomène le plus frappant lors de la découverte de l'ARN interférence fut sa remarquable efficacité : une très faible quantité d'ARN double brin suffit à éteindre complètement l'expression d'un gène. Ceci pourrait être la preuve de la présence d'une étape d'amplification dans le mécanisme d'ARNi. Cette amplification serait prise en charge par des enzymes spécifiques, les ARN polymérase ARN-dépendantes (RNA-dependent RNA polymérase ; RdRP), découvertes en 1999 par Cogoni et Macino dans *Neurospora crassa* [46]. En effet, chez *Arabidopsis* [49], *Neurospora* ou *C. elegans* [239], les mutants pour les RdRP sont déficients pour l'ARN interférence.

L'introduction de siRNA ciblant de l'ARNm déclencherait la production de siRNA dirigés contre d'autres régions de l'ARNm cible, ce que l'on a désigné sous le nom d'ARNi transitive [235].

Dans le modèle actuel, qualifié de « PCR dégénérative », les siRNA servent d'amorces pour la synthèse secondaire d'autres ARN double brin à partir de l'ARNm cible [154]. Il existe une polarité de la RdRP de 5' vers 3' sur le brin antisens : le brin antisens du siRNA s'hybride à

l'ARNm cible, et amorce la réaction de la RdRP qui synthétise un ARN double brin en 5' de la séquence sens (figure 10). Cet ARN double brin (double-stranded RNA ; dsRNA) nouvellement synthétisé est clivé par le Dicer qui génère de nouveaux siRNA. Ce mécanisme présente toutefois un inconvénient non négligeable ; l'ARN interférence s'étend en 5' de la cible originale, ce qui peut amener à la dégradation d'ARNm non ciblés initialement [235].



**Figure 10 :** Synthèse secondaire d'ARN double brin à partir du siRNA apparié à l'ARNm, lors de l'ARNi transitive.

Ce système ne semble pas être obligatoire pour l'extinction de l'expression des gènes dans les cellules humaines, puisqu'en bloquant l'extrémité 3'hydroxylée des siRNA, qui permet l'élongation par la RdRP chez les plantes et nématodes, on n'observe aucune perte d'activité de l'extinction [104]. De plus, on ne connaît pour l'instant aucune RdRP chez les mammifères alors que ces organismes sont compétents pour l'ARN interférence [2]. Il n'y a donc probablement pas de phénomène d'ARNi transitive chez les mammifères [231]. Une raison pouvant expliquer cette différence est l'existence d'une réponse de type interféron chez ceux-ci, contrairement aux plantes ou aux nématodes.

## D) Propagation de l'extinction.

Il a également été remarqué que les plantes étaient capables de répandre l'extinction à l'ensemble de leur organisme [277]. Il en est de même chez *C. elegans* qui peut en plus transmettre le phénomène à sa progéniture [73].

Pour les plantes, il a été démontré que le facteur diffusant de l'extinction post-transcriptionnelle était l'ARN double brin. Il a la capacité de passer de cellules en cellules par l'intermédiaire du plasmodesme, mais aussi d'atteindre des zones plus éloignées via le phloème [277]. Cette extinction systémique est probablement un moyen de défense pour parvenir à stopper la progression des infections virales par l'intermédiaire des tissus vasculaires des plantes [212].

Quant au nématode *C. elegans*, l'extinction se répand d'un tissu à un autre, mais est aussi transmise à la progéniture par l'intermédiaire des cellules gonadiques [73].

## II. EXTINCTION TRANSCRIPTIONNELLE.

Les ARN peuvent également agir comme régulateurs de l'expression des gènes, à un niveau transcriptionnel dans le noyau, à travers un remodelage de la chromatine ou une méthylation de l'ADN. Il est possible que pour économiser la cellule une fois l'ARNm dégradé, l'ARN interférent soit capable d'aller dans le noyau pour éteindre les gènes [212]. Ce phénomène, qui permet de maintenir l'intégrité et la fonctionnalité du génome, n'est pas totalement compris au niveau moléculaire mais a été le plus complètement décrit chez les plantes [2].

Le fait que l'ARNi soit impliquée dans une inhibition transcriptionnelle ne signifie pas seulement que cette extinction est plus efficace. Une différence importante entre le PTGS et le TGS, que ce soit par formation d'hétérochromatine ou méthylation directe des promoteurs, se situe au niveau de l'héritabilité de ce caractère. En effet, la répartition de l'hétérochromatine dans le génome et la méthylation de l'ADN sont des caractères transmissibles, ce qui provoque alors une inhibition à plus long terme [116].

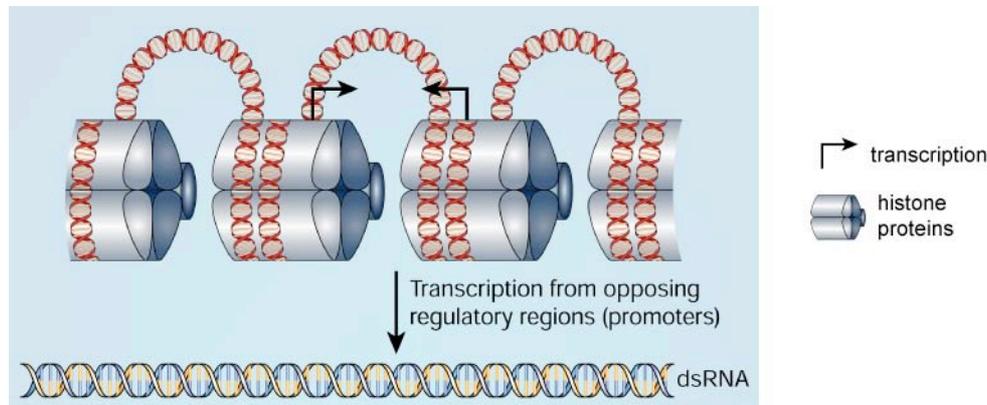
### A) Formation d'hétérochromatine.

On a montré que les siRNA, y compris chez les mammifères, peuvent provoquer la condensation de la région du gène cible en hétérochromatine, forme inactive de l'ADN chromosomique, et que cette transformation est dépendante de la machinerie de l'ARNi [155].

L'hétérochromatine a été découverte il y a plusieurs décennies et consiste en une structure condensée de la chromatine, qui est elle-même une forme compacte d'ADN enroulé sur des protéines d'histone. La chromatine contient peu de gènes exprimés et une forte densité de transposons et de séquences répétées [101, 102]. Cette forme très particulière d'ADN se retrouve principalement au niveau du centromère et des télomères, où elle possède un rôle structural, mais entraîne également une répression génique.

Le mécanisme de formation de l'hétérochromatine s'effectue en deux étapes [85] : il y a tout d'abord nucléation puis expansion le long du chromosome. La nucléation est provoquée par

une modification de l'extrémité N-terminale des histones, comme par exemple la désacétylation ou la méthylation des lysines des histones H3 ou H4.



**Figure 11 : Transcription symétrique de promoteurs opposés.** (d'après Novina, 2004)  
Au niveau de la chromatine, il y a de nombreux transposons et séquences répétées, qui sont transcrits de façon symétrique à partir de promoteurs opposés, ce qui donne naissance à un ARN double brin.

Ce mécanisme de formation d'hétérochromatine est un système de régulation de l'expression des gènes, maintenant l'intégrité du génome. En effet, au niveau de la chromatine, on trouve de nombreux transposons et séquences répétées, qui sont transcrits de façon symétrique à partir de promoteurs opposés (figure 11). Ceci donne naissance à un ARN double brin, pris en charge par la machinerie de l'ARNi afin d'être clivé [196]. L'ARN interférent ainsi obtenu serait incorporé dans un complexe protéique appelé RITS (RNA-Induced initiation of Transcriptional gene Silencing), l'équivalent du RISC, pouvant recruter une méthyltransférase qui va modifier les protéines d'histones [274] et ainsi induire la formation d'hétérochromatine. Deux modèles de reconnaissance de la zone cible peuvent être présentés : soit le siRNA reconnaît directement l'ADN, soit il reconnaît de l'ARN en train d'être synthétisé à ce locus [196].

Comme nous venons donc de le voir, la formation d'hétérochromatine est au départ un phénomène endogène de régulation du génome. Mais en 2003, Schramke et Allshire ont montré qu'elle pouvait également être déclenchée lors du ciblage expérimental d'un gène euchromatinien, forme codante de l'ADN [230].

## **B) Méthylation de l'ADN.**

L'ARN double brin induit chez les plantes une méthylation des gènes au niveau des régions ayant une homologie de séquence, par l'intermédiaire d'une enzyme de méthylation de l'ADN, dépendante de l'ARN [282]. La méthylation de l'ADN se produit au niveau des résidus cytosines mais on n'obtient pas toujours une extinction : si c'est la séquence codante qui est méthylée, il n'y a pas d'effet au niveau transcriptionnel, mais si c'est le promoteur qui est méthylé, il y aura inhibition de la transcription [180].

La méthylation de l'ADN par de telles enzymes n'a été observée que chez les plantes. Cependant, l'ADN de mammifères pourrait être méthylé de cette manière au cours du développement. Le reste du temps, l'ADN est méthylé par l'intermédiaire de formes variées de méthyltransférases [2].

*CHAPITRE 3*  
*Applications de l'ARN*  
*interférence*

## I. OUTIL BIOLOGIQUE.

On estime de 20 000 à 30 000 le nombre de gènes compris dans les 23 paires de chromosomes humains [196]. Le génome étant dorénavant séquencé, le décryptage de la fonction de ces gènes représente une tâche immense à accomplir [96].

A cet effet, un certain nombre de technologies ont été développées : l'analyse des gènes peut être effectuée par étude, au niveau cellulaire, de leur expression dans des conditions données (protéomique, puces ADNc, etc), ou par étude du retentissement de l'extinction d'un gène donné. Ce mode d'étude de la fonctionnalité d'un gène repose sur plusieurs techniques, dont celles du « Knock Out » (KO) de gène, qui consiste à éteindre l'expression d'un gène par recombinaison homologue. On utilise aussi fréquemment la technique des mutations dirigées spécifiquement sur un gène, permettant d'en comprendre le rôle, mais cela se pratique surtout sur les organismes à reproduction rapide. En utilisant le mécanisme d'ARN interférence, on pourrait ainsi étudier la fonction des gènes de n'importe quel organisme, de façon plus simple et rapide qu'avec les techniques employées jusqu'alors.

Ceci est par exemple très facilement réalisable chez *C. elegans*, en le nourrissant directement avec des bactéries exprimant des ARN double brin [260, 261], en injectant les acides nucléiques dans la cavité de leur corps, ou encore en les faisant tremper dans une solution de ces mêmes ARN [251]. C'est ainsi que 19 000 gènes de ce ver ont d'ores et déjà été étudiés, grâce à un ensemble de 12 000 ARN double brin, notamment pour appréhender les problèmes d'obésité et de vieillissement [196].

Chez la drosophile, on a étudié le métabolisme du cholestérol, la formation du cœur, le développement embryonnaire et d'autres processus cellulaires basiques à l'aide de cette technique [140].

## II. OUTIL POUR VALIDER DES CIBLES THERAPEUTIQUES.

Bien que les approches génomiques permettent d'associer un gène à un phénotype de maladie [13, 286], ces seules données ne peuvent définir le rôle de la protéine codée par ce gène, au niveau du processus pathologique. Le développement de souris KO est un bon moyen d'étudier la relation entre un gène biologique et une maladie, puisque les phénotypes KO montrent une bonne corrélation avec l'efficacité des médicaments [294]. Pourtant, le coût et le temps que demande le développement de tels modèles indiquent la nécessité de développer

des méthodes permettant la validation de cibles *in vitro* avant de débiter des études *in vivo* [224].

Face au succès de l'ARNi pour l'étude de la fonction des gènes chez les eucaryotes inférieurs tels que *C. elegans* ou *D. melanogaster*, il n'est pas surprenant que cette approche ait été adoptée pour l'analyse de la fonction des gènes, et particulièrement la validation de cibles dans les systèmes mammifères [224]. En effet, l'industrie pharmaceutique se trouve inondée de nouveaux gènes dont les fonctions sont peu comprises, et qui constituent des milliers de cibles potentielles [269].

Le recours au mécanisme d'ARNi est très attractif dans ce contexte, puisqu'il est rapide, reproductible, efficace et simple à mettre en œuvre sur des systèmes cellulaires. De plus, cette technique peut être adaptée à n'importe quelle cible, sachant qu'à priori, seule l'information de séquence de l'ARNm est nécessaire pour concevoir les ARN double brin. Ceux-ci sont désormais faciles d'accès, grâce aux progrès de la chimie des oligonucléotides [269].

### **III. APPLICATIONS EN THERAPEUTIQUE.**

L'intérêt grandissant des chercheurs pour cet outil puissant ne s'arrête pas là ; ils envisagent d'utiliser l'ARN interférence dans un but thérapeutique [281], entre autres en cancérologie, pour inhiber l'expression d'un oncogène, ou encore en virologie, pour inhiber la multiplication virale.

La spécificité du mécanisme d'ARN interférence permettrait de développer des traitements dénués d'effets secondaires. Il a été démontré qu'un seul mésappariement entre les séquences du siRNA et de l'ARN messenger abolissait l'extinction [11].

De plus, ces traitements présentent une facilité de synthèse et de faibles coûts de production en comparaison des outils thérapeutiques à base de protéines ou anticorps [147].

#### **A) Maladies virales.**

Puisque l'ARN interférence semble être un ancien mécanisme de défense anti-virale chez les mammifères, l'inhibition de la réplication de virus a été considérée comme un bon point de départ pour l'évaluation du potentiel thérapeutique de cette stratégie.

L'inhibition de la réplication virale par ARN interférence a ainsi été démontrée *in vitro* pour une large variété de virus, incluant des virus à ARN tels que le VIH, le rotavirus, le virus respiratoire syncytial, l'influenza virus ou le poliovirus, mais aussi des virus à ADN comme le

papillomavirus ou le virus de l'herpes (Herpes Simplex Virus ; HSV) [82]. Le mécanisme d'ARNi s'est également révélé efficace pour inhiber les virus des hépatites B et C [216].

Bien que la plupart de ces études aient été réalisées *in vitro*, des résultats prometteurs ont été obtenus pour inhiber la multiplication virale chez la souris, notamment en ce qui concerne le virus de l'hépatite B [80], l'influenza virus [264] ou d'autres virus respiratoires [29].

## **B) VIH.**

Parmi les maladies virales, il en est une assez particulière qui représente un grand défi pour les chercheurs, il s'agit de l'infection par le VIH. Si de nombreuses molécules antivirales ont déjà été développées, il est couramment observé une augmentation de la résistance des souches aux médicaments prescrits [156], c'est pourquoi il est nécessaire de persévérer dans la recherche de nouveaux traitements. Le phénomène d'ARN interférence, depuis sa découverte, apporte beaucoup d'espoir.

Tout d'abord, les siRNA peuvent interférer à différentes étapes du cycle intracellulaire de réplication du virus [133]. Mais cette stratégie présente aussi ses limites, compte tenu du comportement du virus. En effet, il suffit d'une différence d'une paire de bases entre la séquence cible et le siRNA pour diminuer drastiquement l'effet, or la transcriptase inverse présente un taux d'erreur élevé, estimé à 1/1 000 par cycle de réplication. D'autre part, il existe une très grande diversité de séquences entre les personnes infectées ; la conception de siRNA efficaces s'avère donc compliquée.

Une approche plus réaliste semble être de cibler les récepteurs ou co-récepteurs dont le virus se sert pour l'infection des cellules [133].

## **C) Cancers.**

Les cellules cancéreuses expriment des protéines qui diffèrent qualitativement et quantitativement de celles des cellules normales, et dans certains cas, la cellule tumorale peut même exprimer une protéine qui n'existe pas à l'état naturel dans la cellule. On voit donc l'intérêt de l'inhibition spécifique de protéines cibles en thérapie anti-cancéreuse. D'autre part, l'absence de miRNA spécifiques a été démontrée dans les cellules carcinomales, impliquant que le développement cancéreux pourrait être stoppé par introduction de ces miRNA manquants [2].

La croissance et la survie des cellules tumorales ont été inhibées en utilisant l'interférence par ARN pour cibler plusieurs oncogènes clés ou gènes promoteurs de tumeurs, incluant des

facteurs angiogéniques et de croissance, ou leur récepteur (facteur de croissance endothélial vasculaire, récepteur du facteur de croissance épidermique), des télomérases humaines, des oncogènes viraux ou des oncogènes transloqués [76]. Ce potentiel d'inhibition de la croissance tumorale a également été démontré *in vivo* [63].

#### **D) Autres maladies.**

La grande spécificité de séquence du mécanisme d'ARN interférence révèle une approche très prometteuse pour inhiber l'expression de gènes responsables de maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington ou l'ataxie spinocérébelleuse, pour lesquelles on ne dispose pas encore de traitement [234].

Une autre grande application de l'extinction par ARNi est le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). En effet, l'œil est un des tissus les plus accessibles et favorables à l'administration locale de siRNA [269]. La cible moléculaire dans le traitement de cette maladie est cliniquement validée depuis longtemps, il s'agit du facteur de croissance endothélial vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor ; VEGF) [53].

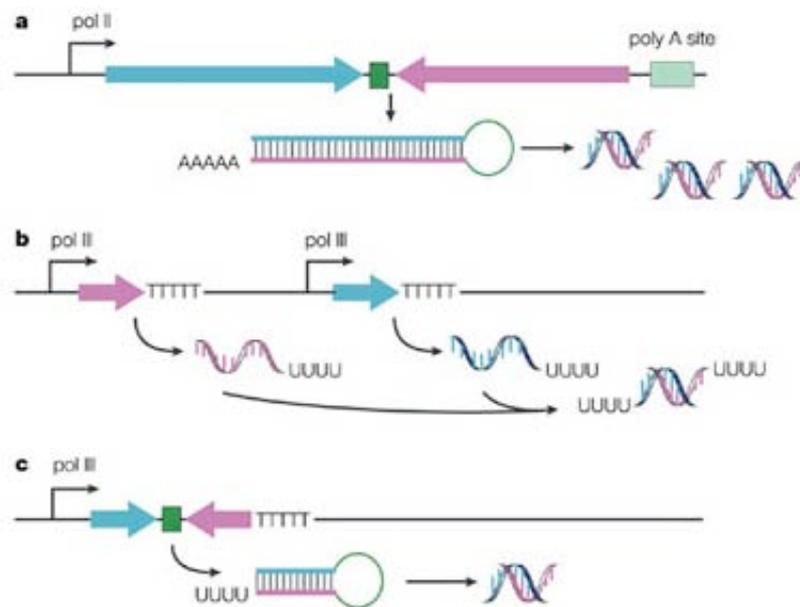
CHAPITRE 4  
*Mise en oeuvre de  
l'ARN interférence*

## I. CHOIX DU DECLENCHEUR.

Il est assez aisé d'initier le mécanisme d'ARN interférence dans les cellules eucaryotes, grâce à la présence de petits ARN double brin dans le cytoplasme. Ceux-ci peuvent être introduits dans les cellules par l'intermédiaire de vecteurs d'expression d'ARN interférents, de longs ARN double brin ou encore, directement sous forme de petits ARN double brin. Chaque système présente des avantages et des inconvénients [64], et le choix de la méthode à employer dépend de l'utilisation que l'on veut faire de l'extinction par ARNi.

### A) Expression endogène de siRNA ou shRNA.

Contrairement aux champignons, aux plantes et aux vers qui sont capables de multiplier leurs siRNA, il n'y a aucun signe de ce mécanisme chez les mammifères [247]. Afin de permettre une expression prolongée de siRNA dans les cellules, plusieurs groupes ont développé des vecteurs ADN qui produisent des substrats pouvant être transformés *in vivo* en siRNA [256, 293].



**Figure 12 :** Méthodes d'expression endogène d'ARN interférents. (d'après Dykxhoorn, 2003)

En premier lieu, on trouve des systèmes d'expression médiés par l'ARN polymérase II (figure 12a). Dans les organismes et types cellulaires où la réponse interféron est nulle ou très faible, des constructions exprimant de longs ARN en épingle à cheveux ont été utilisées. Ces constructions utilisent les promoteurs de l'ARN pol II pour diriger l'expression des ARN en

épingles à cheveux qui pourront être clivés en siRNA par le Dicer [124]. Ces systèmes d'expression ont permis une extinction spécifique dans plusieurs organismes, tels que les oocytes de souris, *C. elegans* et les drosophiles [64]. Bien que ces systèmes se soient révélés très efficaces, leur utilisation est limitée car l'expression de longs ARN en épingle à cheveux induit une réponse interféron dans de nombreuses cellules de mammifères.

Des systèmes d'expression plasmidiques, basés sur l'utilisation de promoteurs de l'ARN polymérase III, ont également été développés par différents groupes (figure 12b, c). Ils permettent de produire des petits ARN, sans déclencher de réponse interféron. Deux promoteurs de pol III ont principalement été utilisés [64] : le promoteur U6 et le promoteur H1, tous deux faisant partie de la classe III des promoteurs de pol III. Deux approches ont été utilisées pour l'expression de siRNA à partir de ce type de constructions :

- expression des deux brins à partir de deux promoteurs différents [143, 183]
- expression d'un petit ARN en épingle à cheveux, qui sera clivé en siRNA par le Dicer [38, 176, 207].

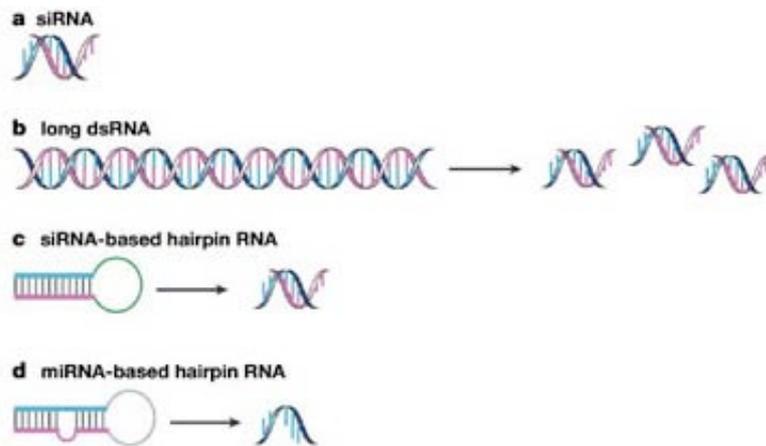
La principale différence entre l'expression de siRNA à partir de brins séparés ou à partir d'un ARN en épingle à cheveux est la dépendance des shRNA vis-à-vis de la prise en charge par le Dicer. Il est difficile de dire laquelle de ces technologies est plus efficace comme outil d'inhibition de l'expression des gènes. Hutvagner et Zamore ont montré que l'introduction de 100 nM de shRNA dans des cellules aboutit à environ 5 nM de miRNA, qui sont capables de cibler l'ARNm aussi efficacement que 100 nM de siRNA [109]. Cela peut signifier que les ARN produits par le Dicer débutent plus efficacement l'étape effectrice que les ARN directement introduits sous forme de siRNA.

Ces stratégies présentent deux avantages principaux. La durée de l'extinction est prolongée, ce qui permet de cibler des protéines qui ont une demi-vie très longue. Il est également possible d'établir des lignées stables pour l'extinction d'une protéine, par incorporation de la nouvelle information génétique au niveau d'un chromosome.

Bien que les vecteurs plasmidiques se soient montrés efficaces, ils souffrent de certaines limitations. On se heurte aux problèmes rencontrés lors de la transfection de gènes, à savoir que l'on doit atteindre le noyau, où le transgène doit être transcrit avant de pouvoir aller exercer son action au niveau du cytoplasme.

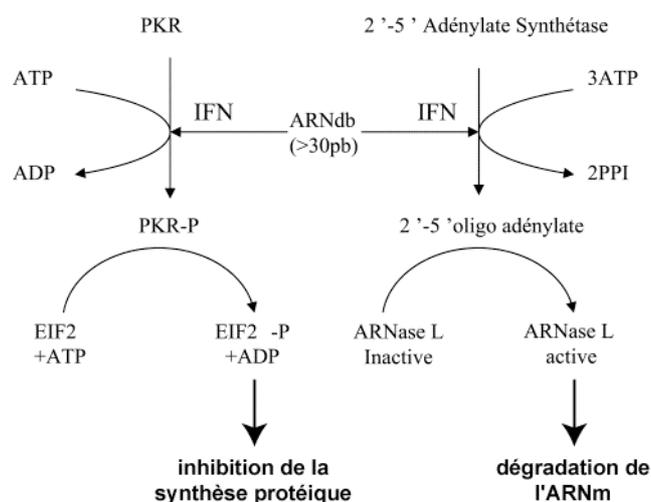
## B) Expression exogène d'ARN interférents.

Pour contourner les problèmes rencontrés avec les systèmes plasmidiques, il est possible d'utiliser directement des ARN interférents pour initier le mécanisme d'extinction.



**Figure 13 :** Méthodes d'expression exogène d'ARN interférents. (d'après Dykxhoorn, 2003)

L'introduction de longs ARN double brin (figure 13b) a été utilisée comme méthode d'investigation de la fonction des gènes dans de nombreux organismes tels que les plantes, *Planaria*, *Hydras*, les trypanosomes, les drosophiles, les moustiques et les oocytes de souris [64]. Les longs ARN double brin permettent une extinction efficace de l'expression génique [39, 286] par présentation de séquences variées de siRNA correspondant à la cible ARNm.



**Figure 14 :** Réponse cellulaire induite par l'interféron.

L'utilisation de cette approche est limitée chez les mammifères parce qu'en présence d'un ARN double brin ayant une taille supérieure à 30 paires de bases, un processus d'inhibition de la traduction est déclenché (figure 14) [66]. Deux mécanismes distincts interviennent dans la réponse induite par l'interféron [246] :

- induction de la 2'-5' adénylate synthétase qui a pour effet d'activer une RNase L hydrolysant le dsRNA
- activation de la protéine kinase PKR qui, par phosphorylation du facteur de transcription eIF2 $\alpha$ , inhibe le processus de traduction.

Pour tester dans quelle mesure les siRNA (figure 13a) peuvent déclencher une extinction efficace sans induire de réponse interféron, Tuschl et son équipe ont introduit dans des cellules mammifères des siRNA synthétisés chimiquement [66, 69]. Ils ont montré que les siRNA étaient fonctionnels *in vivo*, et que cela conduisait à une extinction comparable à celle obtenue avec un long ARN double brin. De plus, ils ont montré que l'extinction observée était spécifique de la séquence ciblée et n'induisait aucun effet non spécifique.

L'utilisation directe de siRNA est plus efficace et plus rapide que le recours à des systèmes plasmidiques, qui nécessitent la transcription de l'ADN et dans certains cas, le clivage par le Dicer [64].

De la même manière, on peut introduire dans les cellules des précurseurs de siRNA ou miRNA (figure 13c, d), sous la forme d'ARN en épingle à cheveux [207]. Comme pour l'expression endogène d'ARN interférents, les shRNA paraissent plus efficaces car leur prise en charge par l'enzyme qui les clive en siRNA ou miRNA favorise leur incorporation consécutive dans la ribonucléoprotéine effectrice de l'extinction.

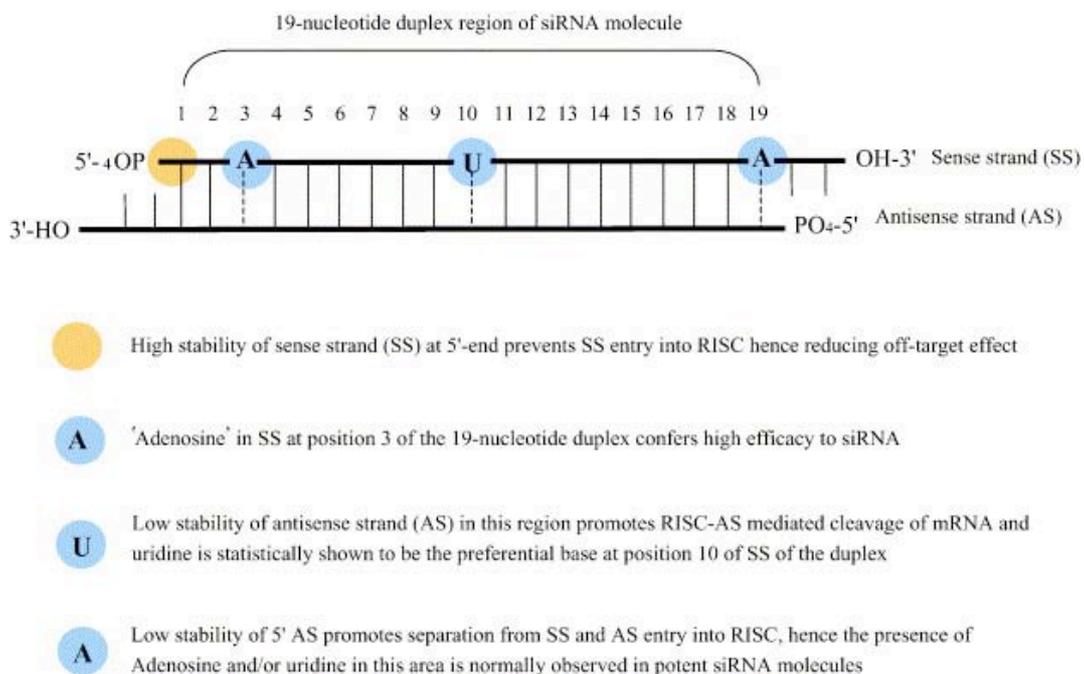
Contrairement aux plasmides, dont la production en grande quantité en culture bactérienne est bien maîtrisée et optimisée depuis longtemps, les siRNA doivent être synthétisés de façon chimique ou enzymatique [2, 55, 64]. Récemment, plusieurs groupes ont utilisé de la RNase III de *Escherichia coli* ou du Dicer humain recombinant afin de cliver *in vitro* de longs ARN double brin en siRNA qui pourront être transfectés dans des cellules mammifères [189, 290]. Cette méthode permet la formation de siRNA ayant des spécificités multiples pour une seule cible, sans induire de réponse interféron. Cependant, la nature transitoire de l'inhibition induite par les siRNA limite le ciblage de protéines qui ont une demi-vie très longue [64].

## II. CONCEPTION DES siRNA.

Tous les siRNA potentiels d'une cible ARNm donnée n'ont pas la même efficacité [104], et plusieurs équipes se sont donc penchées sur les conditions permettant d'obtenir un siRNA le plus efficace possible, et dénué d'effets non spécifiques.

Les siRNA doivent être conçus pour s'hybrider à des sites accessibles de l'ARNm (dépendant de sa structure secondaire) [31, 58, 136], et éviter l'apparition d'effets non spécifiques. Afin d'optimiser les séquences de siRNA, plusieurs groupes ont utilisé la méthode d'activation de la RNase H par un oligodésoxyribonucléotide synthétique. Cette technique permet de déterminer les sites de l'ARNm qui sont dans une conformation compatible avec l'activité des siRNA [276]. Ces études ont montré qu'il existe une corrélation significative entre les sites sensibles à la RNase H et ceux qui permettent une extinction efficace par ARNi.

Pour réaliser une extinction efficace en utilisant un siRNA qui cible un site unique de l'ARNm, il est indispensable de prêter attention à la séquence. Toutes les séquences complémentaires d'un ARNm donné ne sont pas efficaces, et des analyses expérimentales empiriques associées à des analyses mathématiques ont été utilisées pour définir les siRNA efficaces [220, 291].



**Figure 15 :** Conditions de conception d'un siRNA efficace. (d'après Leung, 2005)

La plupart des études *in vivo* rapportent l'utilisation de duplex de 21 nucléotides, contenant un domaine central double brin de 19 bases avec 2 bases non appariées à l'extrémité 3' de chaque brin [68] ; ces molécules imitent les produits naturellement formés *in vivo* par le Dicer (figure 15).

La stabilité intrinsèque des duplex joue un rôle essentiel dans le mécanisme d'ARN interférence. En effet, pour empêcher l'incorporation du brin sens dans le complexe RISC, et éviter un effet non ciblé, il est nécessaire que la stabilité soit plus faible en 5' de l'antisens et plus forte en 3' de l'antisens [141]. D'autre part, une faible stabilité autour de la région centrale permet de faciliter le clivage de l'ARNm [60] par le complexe RISC activé. Les paires de nucléotides G/C confèrent typiquement une plus haute stabilité thermique aux acides nucléiques que les A/U.

En plus de ces considérations de stabilité, pour assurer une efficacité optimale des siRNA et éviter les effets indésirables, il existe certaines règles à respecter quant à la composition nucléotidique [220]. Une base adénosine en position 3 du brin sens semble être requise pour obtenir une grande efficacité d'extinction. Il est également nécessaire d'éviter les séquences palindromiques afin de prévenir tout repliement intra-moléculaire et diminuer la probabilité d'effets non spécifiques. De tels effets peuvent également survenir s'il y a une homologie partielle de séquence avec d'autres ARNm que celui ciblé ou par l'intermédiaire d'une stimulation du système immunitaire inné. Des duplex comportant des séquences riches en GU peuvent ainsi induire l'IFN- $\alpha$ , l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  par interaction avec les récepteurs TLR (Toll-Like Receptor). Pour finir, le contenu global en G/C ne doit pas excéder 40 à 60% [69], et les répétitions en tandem ou de plus de 7-8 nucléotides GC sont à proscrire. Il est intéressant de noter que l'introduction de modifications chimiques sur les riboses du brin antisens, à condition de bien les choisir, peut réduire les effets non spécifiques sans affecter l'extinction de l'ARNm cible [71, 113].

D'autres structures peuvent être utilisées, comme par exemple des duplex asymétriques de 27 nucléotides qui sont des substrats pour le Dicer. Ils ont une efficacité supérieure aux duplex de 21 paires de bases *in vitro* [126], et probablement *in vivo*.

Avant de mettre en oeuvre des études *in vivo*, il est préférable de valider la séquence des duplex de siRNA *in vitro* ; il est en général nécessaire de tester uniquement un petit nombre de duplex avant de trouver le meilleur candidat. Il est préférable de disposer de plus d'un

siRNA efficace pour chaque cible afin de pouvoir contrôler les effets non spécifiques. Pour les applications thérapeutiques, il est bien sûr nécessaire de procéder à plus d'optimisation [22].

### **III. OBSTACLES A LA TRANSFECTION DE siRNA.**

Aucune méthode appropriée n'a été trouvée pour administrer les ARN à l'Homme, bien que certaines données montrent que les siRNA ont des propriétés pharmacocinétiques favorables leur permettant d'être délivrés à une large variété d'organes [35]. Des études indiquent également la possibilité d'une administration systémique chez la souris [174].

Pourtant, il reste des défis à relever pour un développement clinique de l'ARN interférence : il existe des problèmes de stabilité, de distribution, de ciblage et de pénétration cellulaire des acides nucléiques [269]. La technique de l'ARN interférence est, par essence, une thérapie génique et elle peut donc être confrontée aux mêmes problèmes, à savoir faible efficacité et survenue d'effets secondaires immunologiques.

#### **A) Stabilité.**

Il a tout d'abord été pensé que les siRNA nus étaient suffisamment stables dans le sang et le sérum [8]. Des études ont néanmoins mis en évidence la nécessité d'augmenter leur stabilité dans les milieux biologiques [81]. Bien que les duplex siRNA soient plus résistants que des ADN simple brin, ils sont rapidement dégradés par des endo- ou exonucléases quand ils sont administrés en intraveineuse (IV) chez les mammifères [8].

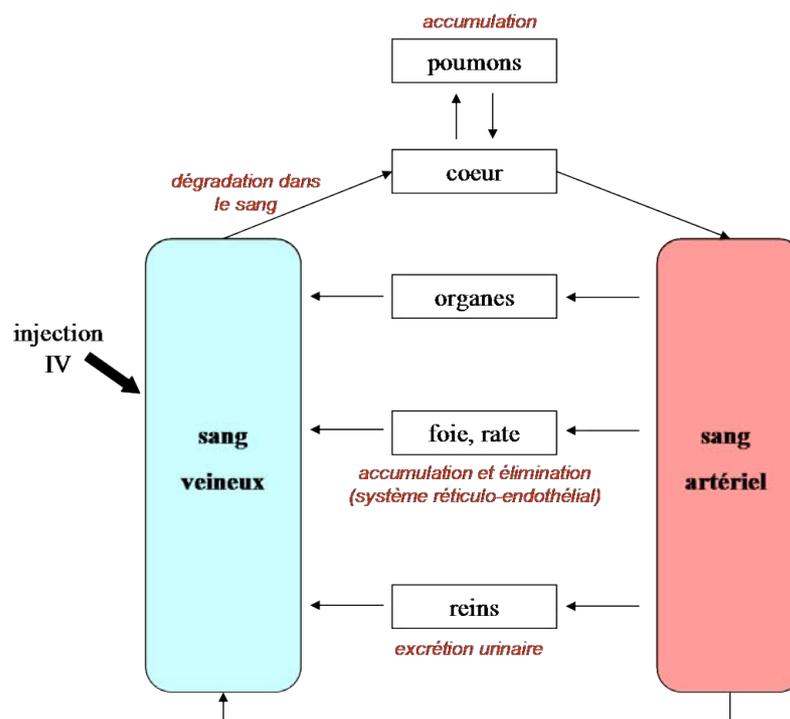
Une manière d'augmenter la stabilité des siRNA sans altérer leur efficacité est de les modifier chimiquement au niveau de leur structure. Une autre alternative consiste à les formuler avec un système de délivrance qui permet non seulement d'augmenter leur stabilité biologique, mais également d'améliorer leur vectorisation intracellulaire. *Ces points seront développés plus loin, dans le chapitre 5.*

Alors qu'il peut être raisonnable d'utiliser des duplex classiques pour des recherches de base *in vivo*, un effet plus soutenu et un éventuel bénéfice thérapeutique peuvent être obtenus en utilisant des duplex modifiés chimiquement et/ou transfectés à l'aide de vecteurs [22].

## B) Pharmacocinétique et biodistribution.

Il est important que les siRNA administrés de façon exogène s'accumulent dans leurs organes ou tissus cibles afin d'exercer leur activité biologique à ce niveau, en limitant les effets sur les tissus non ciblés.

Les macromolécules injectées en IV rencontrent différents obstacles, qu'il leur faut éviter ou surmonter avant d'atteindre leurs organes cibles (figure 16). Le premier obstacle est constitué des capillaires pulmonaires, dont la taille joue un rôle de filtre (involontaire) pour toutes les particules un peu grosses. Dans l'organisme, il existe d'autres « organes filtres », qui sont le foie, la rate et les reins. Lorsque les macromolécules ont une taille inférieure à la limite de filtration glomérulaire (50 kDa, soit environ 6 nm), elles sont excrétées au niveau rénal. Autrement, elles ont tendance à être captées et éliminées par le système réticulo-endothélial, au niveau du foie ou de la rate (surtout si la taille est supérieure à 200 nm).



**Figure 16 :** Représentation schématique de la biodistribution générale, et des obstacles rencontrés lors d'une administration intraveineuse. (d'après Kawakami, 2007)

Les acides nucléiques nus administrés de façon systémique s'accumulent généralement dans les organes du système réticulo-endothélial ou très irrigués, comme le foie, les poumons, la rate, les reins [5]. Il semblerait que les siRNA aient le même comportement [272].

Braasch a montré le premier qu'après une administration systémique chez la souris, les siRNA s'accumulent dans le foie et les reins, et qu'après à peine 5 minutes, ils sont retrouvés

dans les urines [35]. Cela suggère que les siRNA (13 000 Da) se comportent typiquement comme les molécules de moins de 50 kDa, qui sont filtrées au niveau glomérulaire dans les reins et excrétées dans les urines [122].

La formulation des siRNA en des systèmes particuliers d'une taille supérieure à 6 nm, permettrait d'éviter leur filtration glomérulaire, et de prolonger leur temps de circulation dans l'organisme [122]. De même, il pourrait être possible de cibler des tissus ou cellules spécifiques grâce à l'utilisation de ligands, ou de méthodes de transfection ayant un tropisme cellulaire ou tissulaire particulier.

### **C) Internalisation cellulaire.**

La captation cellulaire des siRNA nus est généralement inefficace. Les acides nucléiques sont des molécules polyanioniques et ne peuvent donc ni traverser spontanément une membrane lipidique intacte, ni se lier à la surface cellulaire, qui est chargée négativement [23]. Toutefois, même si aucune étude sur le mécanisme de pénétration des siRNA nus n'a été réellement menée, il semble qu'une très faible quantité de duplex d'ARN puisse être internalisée, puisque des effets ont été observés *in vivo* avec des siRNA nus. Ceci se produirait de la même façon que pour les oligonucléotides antisens ou les ribozymes, c'est-à-dire par certaines formes d'endocytose, telles que la pinocytose [6]. Mais les acides nucléiques, ainsi entrés dans les cellules, se retrouvent emprisonnés dans des vésicules endosomales ou lysosomales [118], subissant alors une dégradation par les nucléases. Il est donc nécessaire de recourir à un système de délivrance pour améliorer la captation cellulaire des siRNA ainsi que leur devenir intracellulaire (*voir chapitre 5*).

### **D) Effets indésirables.**

Comme nous l'avons vu précédemment, les siRNA peuvent induire des effets secondaires liés à leur séquence, mais il peut également y avoir des effets indésirables indépendants de la composition nucléotidique des duplex [170].

Les effecteurs de l'ARN interférence peuvent saturer la machinerie cellulaire, qui ne serait alors plus disponible pour les molécules endogènes, telles que les miRNA, interrompant ainsi leur activité de régulation [86]. Pour éviter ce phénomène, il est préférable d'utiliser des concentrations d'ARN interférents les plus faibles possibles.

Bien que les siRNA paraissent être incapables de stimuler une réponse immunitaire comme celle observée avec les longs ARN double brin [66], il a depuis été montré qu'ils pouvaient induire la production d'interféron, de manière indépendante de leur séquence mais dépendante de leur concentration [238]. Cette stimulation immunitaire dépend du type cellulaire et de la longueur des duplex [221], et pourrait être médiée par la voie PKR décrite plus haut (figure 14), ou par les TLR, principalement les TLR3 [120]. De la même façon que précédemment, l'utilisation de faibles doses de siRNA permettrait de contrôler la stimulation de réponses de type interféron. Il existe également des modifications chimiques permettant de prévenir l'activation de la voie PKR [214].

Toutefois, dans le cadre du traitement de certaines pathologies, notamment virales, un certain degré de réponse interféron pourrait être bénéfique, dans le sens où cela aiderait le système immunitaire à combattre l'infection.

## **IV. MODES D'ADMINISTRATION *IN VIVO*.**

La voie d'administration des siRNA joue un rôle sur la quantité nécessaire, la distribution tissulaire, les éventuels effets secondaires et la nécessité de recourir à des modifications chimiques ou à un agent de transfection [22]. La première étape est de regarder si la cible se prête plutôt à une administration locale (tumeurs solides accessibles, tumeurs superficielles, lésions de la peau ou muqueuses, ...) ou à une administration systémique [8].

Evidemment, le mieux serait de pouvoir développer des stratégies pour l'administration orale de siRNA, mais l'environnement à l'intérieur du tractus gastro-intestinal est défavorable aux thérapeutiques basées sur l'utilisation de protéines ou d'oligonucléotides. Le tractus gastro-intestinal peut être considéré comme une surface du corps exposée, qui interagit avec un environnement extérieur par l'intermédiaire de la nourriture. Les enzymes digestives, les valeurs de pH extrêmes, la couche protectrice de mucus, aussi bien que la flore microbienne font de cet organe une cible difficile pour les thérapeutiques biologiques [194]. Toutefois, certaines équipes travaillent sur l'administration d'ARN interférents par voie orale, à l'aide de bactéries inactivées mais exprimant ces acides nucléiques [115, 227].

Un avantage très sérieux de l'administration systémique par IV est qu'elle est plus largement utilisée en clinique, où plus de maladies nécessitent des traitements en intraveineuse [8]. L'administration IV est attractive de par sa relative simplicité d'utilisation, et la distribution

tissulaire large qui peut être obtenue. Toutefois, comme nous l'avons souligné auparavant, la taille des particules est déterminante pour une telle administration. Une petite taille est essentielle pour franchir les barrières physiologiques connues : les particules doivent pouvoir sortir du système réticulo-endothélial, s'extravaser à travers l'endothélium vasculaire, diffuser à l'intérieur d'un tissu et jusqu'aux cellules cibles [36, 50, 297]. Les particules de moins de 6 nm sont excrétées au niveau urinaire, et celles de plus de 200 nm peuvent d'obstruer les vaisseaux sanguins [122] ou être captées par le système réticulo-endothélial.

Compte tenu de la biodistribution classiquement observée à la suite d'une injection IV, l'administration des siRNA par cette voie permet principalement le ciblage des poumons, du foie, de la rate ou encore des reins. Elle a été utilisée chez la souris pour les protéger d'une hépatite fulminante induite expérimentalement. Song a administré des siRNA anti-Fas par IV, sur une période de 24h. Les résultats montrent que ces siRNA diminuent l'expression des récepteurs Fas sur 10 jours, et protègent les souris de fibrose du foie [242].

Pour une administration systémique, il est également important de considérer les autres voies d'injection possibles, telles que l'injection intrapéritonéale ou l'injection sous-cutanée [22].

L'administration locale peut être utilisée pour obtenir de fortes concentrations au niveau du site cible, tout en utilisant une dose totale faible, afin de minimiser les risques d'effets secondaires systémiques [22]. L'administration locale permet d'éviter que les siRNA ne soient rapidement éliminés par le foie ou les reins. Ils ne nécessitent qu'une formulation simple et peuvent donc être produits et administrés facilement. Ils peuvent également être délivrés jusqu'à leur site d'action, permettant l'utilisation de doses plus faibles, et permettant de limiter les effets non spécifiques. C'est la stratégie probablement la plus efficace pour la transfection de siRNA *in vivo* [40].

L'administration locale peut être réalisée par injection directe (dans une tumeur, une articulation ou de façon intraoculaire) ou par application topique sur une surface (absorption transépithéliale par l'intermédiaire des muqueuses orales, rectales ou encore vaginales). L'administration directe dans le système nerveux central peut être obtenue par injection intrathécale ou intraventriculaire, permettant de s'affranchir des problèmes de passage de la barrière hémato-encéphalique. L'administration intratrachéale, intranasale ou par inhalation permet de cibler les poumons.

CHAPITRE 5  
*Méthodes de transfection*

Compte tenu des nombreux obstacles à l'utilisation thérapeutique répandue de l'ARNi, la sélection et la formulation des siRNA avec un système de transfection compatible s'avère nécessaire pour i) une stabilité accrue, ii) une bonne pharmacocinétique, iii) le ciblage et la pénétration cellulaire, ces éléments favorisant une grande efficacité d'extinction avec de faibles concentrations de siRNA.

La plupart des études mécanistiques et de développement de systèmes de transfection ont été réalisées *in vitro*, mais elles permettent de tirer certains enseignements pour la transfection *in vivo* des siRNA [8]. Elles indiquent que les conditions de transfection doivent être optimisées pour chaque modèle cellulaire et que l'efficacité de captation ou d'extinction dépend :

- des caractéristiques du duplex siRNA (chimie, longueur, charge)
- du vecteur de transfection (masse moléculaire, taille physique, chimie, charge, structure)
- du système de culture cellulaire (type cellulaire, conditions de croissance, incluant la présence de sérum)
- de la nature du gène cible ou de la protéine ciblée (quantité et demi-vie). Pour atteindre plus de 90% d'extinction, le siRNA doit rester efficace plus de trois fois le temps de la demi-vie de la protéine ciblée. Ceci peut nécessiter plusieurs administrations, notamment dans les cellules qui se multiplient rapidement [20].

Les mêmes optimisations doivent être réalisées pour la transfection de siRNA *in vivo* et des modèles expérimentaux doivent être développés [7, 81].

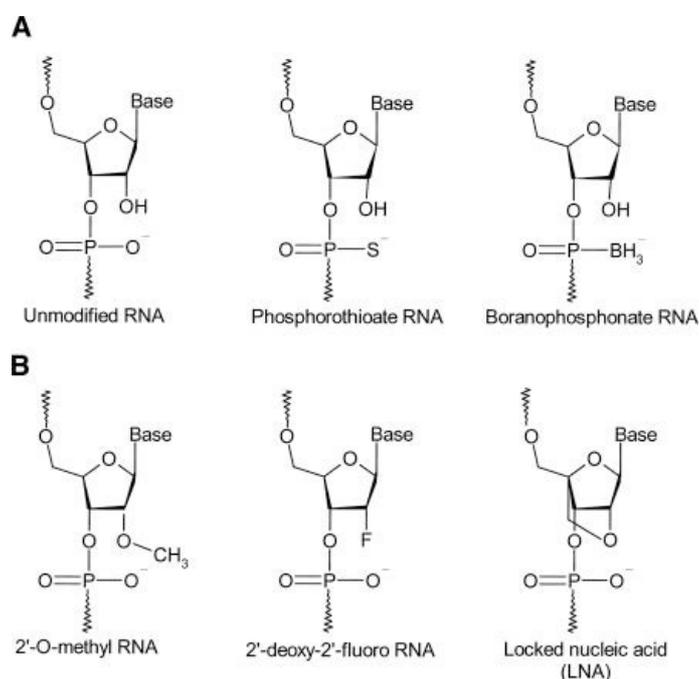
## I. MODIFICATIONS CHIMIQUES.

Si les siRNA apparaissent plus résistants à la dégradation par les nucléases que les acides nucléiques simple brin [28], les enzymes présentes dans le sérum peuvent tout de même les dégrader [35, 209]. Plusieurs groupes se sont penchés sur l'utilisation de modifications chimiques qui améliorent la stabilité et protègent les siRNA contre la dégradation dans des environnements riches en nucléases [42, 169].

Une grande variété de modifications chimiques qui confèrent une résistance vis-à-vis des nucléases a été utilisée avec succès pour les oligonucléotides antisens et les ribozymes. Nombre d'entre-elles peuvent être directement transposées aux siRNA et fournir les mêmes effets bénéfiques [22]. Plusieurs modifications chimiques du squelette ou des sucres ont ainsi

été utilisées pour les siRNA. De cette manière, leur dégradation dans le sérum ou les cellules peut être repoussée de quelques minutes à quelques heures [34]. Des modifications chimiques judicieusement choisies sur le brin antisens ont apporté des améliorations de l'activité dans le sens où elles permettent de réduire les effets non spécifiques [55] et de modifier la stabilité à l'intérieur des séquences du siRNA [34].

Cependant, les duplex siRNA sont sensibles à la structure [11] donc les modifications chimiques doivent être étudiées pour ne pas perdre d'efficacité ou entraîner une cytotoxicité (les modifications phosphorothioates sont connues pour être toxiques dans des cas précis [1]).



**Figure 17 : Modifications chimiques des siRNA.** (d'après De Paula, 2007)  
 (A) modifications du lien phosphate ; (B) modifications de la position 2'

La première catégorie de modifications chimiques des siRNA concerne le lien inter-nucléosidique phosphodiester, qui peut être transformé en phosphorothioate ou boranophosphate (figure 17A).

Les modifications phosphorothioates peuvent être facilement introduites dans le duplex ARN, à la position désirée, et permettent de renforcer la résistance aux nucléases quand le duplex est exposé à du sérum ou à d'autres sources de nucléases [22]. De telles modifications chimiques ont remporté un franc succès pour l'application des antisens *in vivo*, mais des études ont montré qu'une toxicité et une perte d'activité peuvent être un problème avec des siRNA [55]. En effet, des modifications limitées conservent l'efficacité du siRNA alors que des modifications extensives entraînent une baisse d'efficacité et/ou une augmentation de toxicité

[11]. Des modifications phosphorothioates extensives peuvent également mener à des « artefacts » à cause de liaisons non spécifiques aux protéines [137]. Il est ainsi préférable de limiter le nombre de ces modifications aux positions terminales, où l'augmentation de la résistance aux nucléases est probablement plus importante.

Les ARN modifiés par des boranophosphates ont une importante résistance aux nucléases, mais ils sont difficiles à produire selon les méthodes standards de synthèse chimique [93]. Il est nécessaire d'incorporer de façon enzymatique les bases modifiées, à l'aide d'une transcription *in vitro*. Cette particularité implique malheureusement un emplacement aléatoire des modifications sur les acides nucléiques. Les siRNA boranophosphates, agissant bien par le biais de la voie ARNi standard, sont dix fois plus résistants aux nucléases que les siRNA non modifiés, mais sont aussi plus efficaces que des phosphorothioates [93].

Un second type fréquent de modifications chimiques concerne la position 2' du ribose (figure 17B). Ceci permet d'augmenter la stabilité interne des siRNA ou de leur apporter différents degrés de résistance aux nucléases, sans diminuer l'extinction induite *in vivo*. Contrairement aux modifications décrites précédemment, des modifications en 2' peuvent être incorporées sur la totalité du duplex [9].

Les nucléotides 2'-O-méthyl, naturellement présents dans les ARN ribosomiaux de mammifères [22], permettent de maintenir l'efficacité des siRNA tout en leur conférant une grande stabilité dans le sérum [11, 42, 47]. Le profil d'incorporation est important car des ARN entièrement substitués avec des 2'-O-méthyl sont inefficaces pour déclencher l'ARNi. Il est préférable d'alterner nucléotides modifiés et nucléotides classiques, pour augmenter la stabilité tout en conservant l'activité [47].

Des modifications 2'-fluoro ont également été utilisées avec de bons résultats [34]. Cette modification est généralement incorporée sélectivement au niveau des bases pyrimidines. Leur utilisation, seules ou en association avec des modifications 2'-O-méthyl des purines, stabilise les duplex et leur confère une plus grande efficacité.

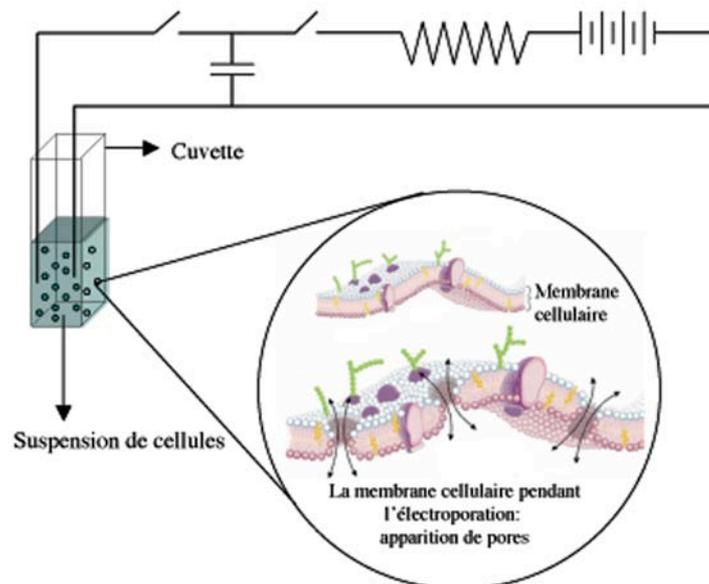
Des siRNA ont aussi été modifiés par incorporation de quelques résidus locked nucleic acid (LNA), qui permettent d'augmenter la demi-vie plasmatique et de stabiliser la structure du duplex sans affecter l'activité biologique [70]. Les LNA sont des modifications 2' d'une catégorie différente ; un pont méthylène relie le 2'-O au 4'-C du ribose, ce qui bloque le ribose dans la conformation 3'-endo. Les LNA peuvent être incorporés dans les siRNA, mais le positionnement idéal pour obtenir les meilleurs effets est plus restrictif que dans le cas des 2'-O-méthyl ou 2'-fluoro.

## II. METHODES PHYSIQUES.

Beaucoup de lignées cellulaires sont réfractaires à la transfection, notamment les cellules primaires, ce qui nécessite le recours à des méthodes physiques. Celles-ci permettent l'entrée cellulaire des acides nucléiques par perturbation des membranes à l'aide de chocs électriques, osmotiques, thermiques ou mécaniques [24].

### A) Electroporation.

Le principe de l'électroporation, appelée aussi électroperméabilisation, est de soumettre les cellules à un courant rapide de haut voltage (de l'ordre du kV/cm), ce qui crée des pores temporaires dans les membranes, permettant l'entrée des acides nucléiques [23] (figure 18).



**Figure 18 : Principe de l'électroporation.**

Cette méthode a été utilisée pour la première fois en 1982 afin d'introduire de l'ADN dans des cellules de mammifères [191]. Toutefois, même si cette technique ne présente pas de limitation de taille ou de type cellulaire [79], son application est difficile à optimiser, compte tenu de la faible efficacité de transfection et de la mort cellulaire induite. De plus, cette méthode est invasive puisqu'elle nécessite l'implantation d'électrodes dans la région cible [131].

Appliquée aux siRNA, cette méthode permet une haute captation cellulaire (plus de 90%), malheureusement accompagnée d'une faible viabilité cellulaire, inférieure à 60% [175]. L'électroporation a été utilisée pour délivrer des siRNA dans les reins [253], le cerveau [4], les yeux [172], les muscles [83, 132], la peau [303] et les articulations [111] de rongeurs.

## **B) Injection hydrodynamique.**

Décrite au départ pour la délivrance d'ADN plasmidique dans des organes variés [157, 302], l'injection hydrodynamique de siRNA a été utilisée pour éteindre l'expression génique dans différents tissus [174].

Il s'agit d'une injection rapide (3-5s) de grands volumes de solutions physiologiques (environ 50 ml/kg), à l'origine au niveau de la veine de la queue des souris [149]. Les tissus préférentiellement atteints par cette méthode de délivrance sont le foie, les reins, la rate, les poumons et le pancréas. Le mécanisme par lequel les siRNA sont délivrés aux cellules reste imprécis : la forte pression créée entraînerait des perturbations au niveau des membranes, facilitant ainsi la captation des siRNA [233].

L'injection hydrodynamique de siRNA permet la meilleure délivrance possible *in vivo*, bien que cela reste limité aux tissus très vascularisés. Cette technique a été la première utilisée pour démontrer le potentiel de l'ARN interférence chez les mammifères [148, 174]. Une extinction efficace dans le foie de souris a ainsi été obtenue avec cette méthode de transfection, que ce soit avec des siRNA non modifiés ou modifiés [80].

L'injection hydrodynamique a principalement été vue comme un outil de recherche puisqu'elle n'est pas directement transposable à un usage clinique, à cause des grandes quantités à injecter et de la toxicité cellulaire induite par la forte pression générée [8].

Toutefois, Hagstrom et son équipe ont adapté cette méthode pour délivrer des siRNA, et d'autres acides nucléiques, dans les muscles squelettiques de rats, de chiens et de macaques rhésus [91]. Dans cette variante, la technique consiste à isoler fonctionnellement un muscle à l'aide d'une sorte de garrot, et à administrer de façon IV de larges solutions d'acides nucléiques. La délivrance thérapeutique de plasmides ou de siRNA à l'Homme grâce à cette stratégie a été proposée ; si des précautions sont prises, on peut ne provoquer que des dommages tissulaires modérés et réversibles [265].

### **C) Ultrasons.**

Cette technique repose sur la capacité des ultrasons à augmenter de façon temporaire la perméabilité membranaire. Ce phénomène pourrait être le résultat de la formation de microbulles finissant par se rompre et engendrant ainsi des cavitations [89]. Une autre théorie avance le fait qu'un jet de haute vitesse est produit (plus de 600 km/h), provoquant l'augmentation de perméabilité membranaire [128]. L'efficacité de transfection augmente avec l'index mécanique, la fréquence et le temps d'exposition. Ces paramètres doivent être optimisés pour limiter les dommages causés aux cellules.

Les ultrasons peuvent ainsi être utilisés pour délivrer des siRNA, comme le démontre le travail préliminaire réalisé *in vitro* par Kinoshita [131].

### **D) Bombardement de particules.**

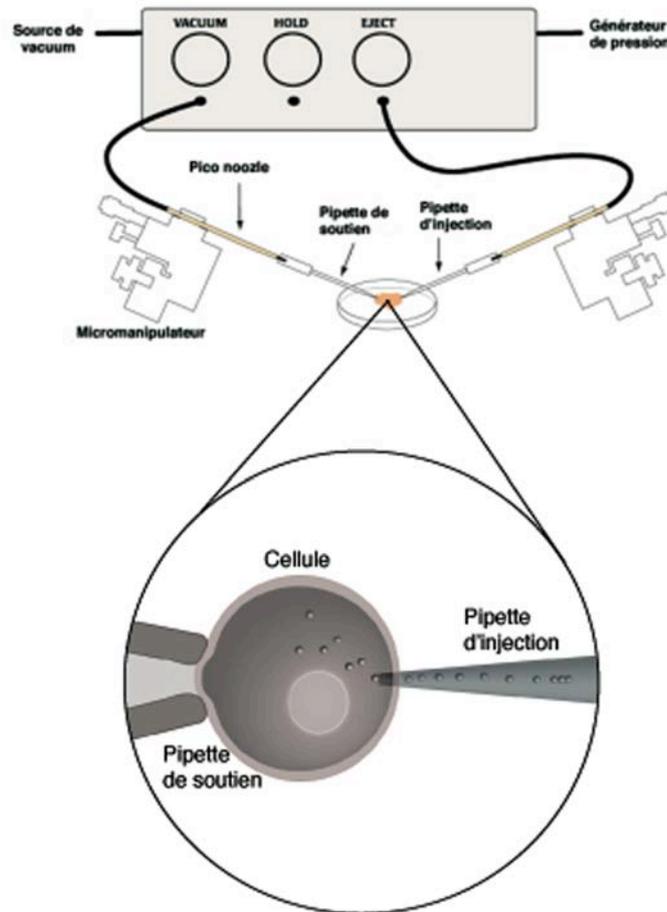
Cette technique consiste à projeter à grande vitesse, par force électrostatique ou pression, de très petites particules de métal (tungstène ou or) recouvertes d'acides nucléiques [23]. Ceci est rapide, simple, sûr et applicable à une grande variété de cellules, sans limite de taille ou de quantité de matériel [79].

L'administration intradermique à l'aide d'un « pistolet » a été utilisée *in vivo* pour transférer des siRNA afin d'améliorer l'efficacité de vaccins contre le cancer [129].

### **E) Microinjection.**

Il s'agit de la méthode la plus simple pour introduire des acides nucléiques dans des cellules, avec une efficacité de 100%. Elle consiste à introduire directement une macromolécule dans le cytoplasme ou le noyau des cellules à l'aide d'un capillaire en verre ultrafin (figure 19).

Cette technique nécessite beaucoup de temps et du matériel spécifique, et c'est aussi la plus difficile à appliquer [79]. Toutefois, elle permet de contourner les problèmes de captation cellulaire dans les cellules particulièrement difficiles à transférer, telles que les cellules primaires ou les neurones, et a donc déjà été appliquée *in vitro* aux siRNA [270].



**Figure 19 :** Principe de la microinjection.

### III. METHODES VIRALES.

Utilisés depuis plus de 20 ans dans le cadre de la thérapie génique, les vecteurs viraux ont récemment été appliqués à l'ARN interférence afin de délivrer aux cellules des vecteurs d'expression endogène d'ARN interférents.

Le recours à des virus pour transporter des acides nucléiques repose sur le constat d'efficacité de ceux-ci à transférer leur propre matériel génétique dans les cellules humaines [48]. Pour produire des vecteurs viraux, on utilise des virus modifiés génétiquement, dits sécurisés. Le principe consiste à éliminer les séquences du virus qui codent les protéines, notamment celles associées à un éventuel comportement pathogène du virus, et à ne conserver que celles qui sont utilisées pour construire la particule virale, et assurer le cycle d'infection. Le génome du virus est alors modifié pour porter les séquences exprimant les ARN interférents.

Les vecteurs viraux sont des systèmes de transfection très efficaces, mais leur application clinique est freinée par les inconvénients qu'ils présentent [258]. Ils peuvent induire des

réponses immunitaires et/ou s'intégrer de façon aléatoire dans le génome hôte. De plus, leur production s'avère relativement complexe et coûteuse.

Néanmoins, un certain nombre d'approches virales ont été étudiées, chez les primates et les humains, qui concernent principalement cinq types de vecteurs viraux construits pour exprimer notamment des ARN en épingle à cheveux. Cela permet en effet d'initier une inhibition à long terme de l'expression de gènes cibles, caractéristique importante pour le traitement d'infections chroniques.

## **A) Rétrovirus.**

Les rétrovirus ont été parmi les premiers vecteurs utilisés pour transfecter des cellules avec des ARN en épingle à cheveux. Ce sont des virus à ARN, et lors de l'infection, il y a une étape de rétrotranscription du génome en un fragment d'ADN qui pourra être intégré aux chromosomes. L'information génétique désirée se trouve alors insérée dans le génome de la cellule cible, le nouveau gène se transmettant de cellules mères en cellules filles.

Une étude de Brummelkamp [37], utilisant des rétrovirus, a démontré la grande spécificité du concept d'ARNi et son intérêt dans des applications thérapeutiques, notamment en oncologie.

Alors que les rétrovirus sont très efficaces *in vitro*, ils souffrent de plusieurs inconvénients pour être appliqués *in vivo*, et plus spécialement en clinique chez l'Homme [12].

En effet, compte tenu du mode d'intégration dans le génome hôte, leur sécurité d'emploi n'est pas totale : il existe un risque d'insertion mutagène, et potentiellement carcinogène. Trois patients d'un essai clinique de thérapie génique (transfert d'ADN), utilisant ces rétrovirus pour traiter le syndrome d'immunodéficience sévère lié à l'X, ont développé des leucémies [90]. Ceci explique la faible utilisation des vecteurs rétroviraux *in vivo* et pourquoi les autres types de vecteurs sont plutôt favorisés dans les expérimentations d'ARN interférence.

Une limitation supplémentaire à l'utilisation des rétrovirus vient du fait qu'ils sont efficaces seulement sur les cellules en division. La plupart des cellules mammifères ne se divisent pas et les rétrovirus ne peuvent donc pas les atteindre.

## **B) Lentivirus.**

Les lentivirus font partie d'une sous-classe des rétrovirus, et se sont révélés très attrayants en tant que vecteur de transfection, pour des applications *in vivo*. Bien qu'il existe également des problèmes de sécurité d'emploi, ce type de virus est dénué de la plupart des inconvénients des rétrovirus [150]. En effet, il n'y a que peu de risque d'insertion mutagène et les lentivirus sont capables de transfecter efficacement des cellules primaires ou des cellules quiescentes. De plus, les lentivirus sont capables d'incorporer de grandes quantités de matériel génétique et ne sont que faiblement immunogènes.

Les lentivirus ont principalement été utilisés pour des applications locales, et leur capacité à transfecter des cellules quiescentes, telles que les neurones, font de ces virus un des systèmes de choix pour les applications au niveau du système nerveux.

Ils ont ainsi été utilisés avec succès pour réguler des gènes cibles dans le cerveau après injection locale [18, 59]. L'équipe de Singer a utilisé des vecteurs lentiviraux sur un modèle murin de maladie d'Alzheimer. Ils ont ciblé un gène impliqué dans le clivage de précurseurs d'amyloïde, et ont obtenu une réduction de la formation des plaques typiques de la maladie [237].

D'autre part, suite à une injection intramusculaire, le lentivirus EAIV, virus de l'anémie infectieuse équine, est capable d'infecter les motoneurones spinaux. Il a été utilisé sur un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique (SLA), et a permis de retarder l'apparition des symptômes de la maladie, tout en augmentant la survie des animaux [150].

Une voie de recherche prometteuse pour augmenter l'application des lentivirus dans le cadre de l'ARN interférence concerne le développement de virus qui auraient un certain tropisme tissulaire. Pour ce faire, il s'agit d'inclure du matériel d'enveloppe d'autres virus ayant une spécificité pour certaines cellules [165].

## **C) Adénovirus.**

Il s'agit d'un virus à ADN qui présente la caractéristique de faire pénétrer son matériel génétique sans attendre la mitose cellulaire, et sans insérer la nouvelle information génétique dans le génome de la cellule cible. L'information génétique est extrachromosomale, mais ceci implique qu'elle est conservée de façon moins stable dans les cellules et peut être perdue durant les divisions cellulaires successives. Les adénovirus représentent les vecteurs adéquats

pour toutes les applications où un effet transitoire est suffisant (par exemple, en thérapie génique anti-tumorale).

Les vecteurs adénoviraux sont très utilisés pour les essais cliniques de thérapie génique en transfert d'ADN, puisqu'on les retrouve actuellement dans environ 25% d'entre-eux [218]. Dans la littérature, on retrouve également de nombreux articles décrivant l'utilisation de ce type de vecteurs pour l'application thérapeutique de l'ARN interférence *in vivo*.

La première étude d'ARNi ayant utilisé un vecteur adénoviral *in vivo* a été publiée en 2002 et concerne des applications dans le système nerveux central [288]. Chez une souris transgénique exprimant la GFP, Xia et son équipe ont obtenu une extinction de cette protéine dans le cerveau, suite à une injection locale. Même si cet essai concerne une protéine exogène et n'implique aucun résultat thérapeutique, cela prouve le potentiel d'applications médicales de l'ARNi au niveau du cerveau, que ce soit pour étudier sa fonction, ou pour le traitement de maladies dégénératives.

Afin d'utiliser l'ARNi en thérapie anti-cancéreuse, de nombreux groupes ont utilisé des vecteurs adénoviraux, exprimant des ARN en épingle à cheveux. Ils ont eu recours à des injections locales au niveau de tumeurs sous-cutanées dans le but de stopper leur croissance. Une grande variété d'oncogènes a été ciblée dans différents types de tumeurs, et une réduction de la croissance tumorale a très souvent été obtenue dans ces études [88, 151, 205, 304].

Il n'existe qu'un nombre limité d'études rapportant l'utilisation systémique des vecteurs adénoviraux pour l'ARNi *in vivo*. Une de ces études a été réalisée par injection intraveineuse d'un adénovirus contenant une construction ciblant la  $\beta$ -glucuronidase murine, et son expression au niveau du foie s'en est trouvée diminuée [288].

L'hépatotoxicité des adénovirus, limitant leur dose d'utilisation en IV, et leur manque de spécificité cellulaire, impliquent la nécessité de développer de nouvelles stratégies afin d'améliorer le tropisme cellulaire ou tissulaire de ces vecteurs viraux. Une nouvelle génération de vecteurs adénoviraux pour la thérapie génique *in vivo* a vu le jour, ce qui offre des perspectives prometteuses pour l'application ciblée de l'ARNi [195].

### **D) Virus associé à l'adénovirus (AAV).**

Ce type de vecteur viral semble être très prometteur pour délivrer des siRNA, puisqu'il présente de nombreux avantages. En effet, on ne lui connaît aucune pathogénicité, et il peut être appliqué à un large spectre de cellules cibles, incluant les cellules quiescentes.

De nombreuses publications rapportent le succès de son utilisation *in vitro* [184, 263] mais il existe peu d'études réalisées *in vivo*. En effet, ces vecteurs viraux ont seulement été utilisés par injection locale au niveau du cerveau [16, 289].

La place du virus associé à l'adénovirus en tant que méthode de transfection d'ARNi *in vivo* demande donc à être étudiée attentivement.

### **E) Baculovirus.**

Le baculovirus, virus d'insecte qui présente plusieurs avantages, est actuellement dans ses premières phases d'essai en tant que vecteur potentiel d'ARNi *in vivo* [150]. Son premier intérêt est qu'il peut contenir de grandes quantités d'information génétique. Il peut donc être utilisé à la fois comme vecteur en thérapie génique, et comme vecteur d'inhibition de l'expression de gènes. Le second avantage de ce virus concerne sa sécurité d'utilisation potentielle, étant donné qu'il est incapable de se répliquer et d'exprimer des protéines virales dans les cellules mammifères.

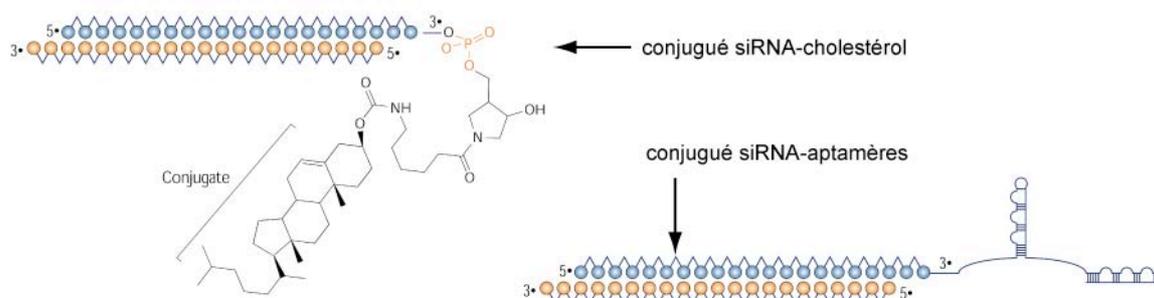
Dans une étude sur un modèle animal, Ong [203] et son équipe sont parvenus à diminuer l'expression du gène de la luciférase dans le cerveau de rats, après co-injection d'un baculovirus comportant un plasmide codant pour la luciférase et un vecteur de shRNA ciblant cette même protéine.

## **IV. METHODES NON VIRALES.**

Même lorsque l'on utilise des modifications chimiques pour stabiliser les duplex face à la dégradation, leur clairance plasmatique peut être rapide. L'utilisation d'un agent de transfection peut améliorer la pharmacocinétique et la délivrance des siRNA. Le recours à des méthodes chimiques de transfection est plus sûr que l'utilisation de vecteurs biologiques [23].

## A) Conjugaison.

La conjugaison à des groupements lipophiles ou des aptamères (figure 20) peut augmenter la pharmacocinétique, la biodistribution tissulaire et la captation cellulaire des oligonucléotides, tels que les siRNA.



**Figure 20 :** Stratégies de transfection des siRNA par conjugaison. (d'après De Fougerolles, 2007)

Cette technique de conjugaison est particulièrement attractive puisque dans les siRNA, seulement un des deux brins est actif (le brin antisens). Il est possible d'attacher les groupements souhaités au niveau du brin sens sans entraver l'activité d'inhibition du second brin. Les conjugués peuvent au choix être placés à l'extrémité 3' ou 5' du brin sens, et quelquefois en 3' de l'antisens [97].

### **1-Groupements lipophiles.**

L'objectif de la conjugaison des siRNA à des groupements lipophiles est d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques et leur biodistribution. Après administration systémique, les siRNA conjugués à des groupements lipophiles sont détectés au niveau du foie, du cœur, des reins, des tissus adipeux et pulmonaires [244]. Ces propriétés pharmacocinétiques correspondent aux observations précédemment réalisées avec les prodrogues lipophiles [201]. Il se trouve en effet que celles-ci sont distribuées dans l'organisme selon leur interaction avec des protéines sériques.

Dans un deuxième temps, il s'agit d'augmenter la captation cellulaire des siRNA, que ce soit par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, ou en facilitant leur passage transmembranaire.

Pour améliorer la délivrance de siRNA dans le foie humain sans utiliser d'agent de transfection, Lorenz et son équipe ont synthétisé des siRNA conjugués à des dérivés de cholestérol, d'acide lithocholique ou d'acide laurique [160]. La partie lipidique a été attachée de façon covalente à l'extrémité 5' des siRNA, sur le brin sens, le brin antisens, ou sur les

deux brins, grâce à la chimie des phosphoramidites. Ces siRNA se sont révélés capables d'inhiber l'expression des protéines ciblées (la  $\beta$ -galactosidase et une protéine du VHC), d'autant plus efficacement lorsque la partie hydrophobe se trouve sur le brin sens.

De même, par conjugaison de cholestérol en 3' du brin sens du siRNA au moyen d'un lien pyrrolidine, Soutschek a montré qu'il améliorait les propriétés pharmacocinétiques des siRNA. Chez le rat, des duplex modifiés non conjugués ont une demi-vie d'élimination de 0,1h alors que des siRNA conjugués à du cholestérol ont une demi-vie de 1,5h [244]. En plus d'augmenter la résistance contre les nucléases, la conjugaison au cholestérol stabilise les siRNA dans le sang, par augmentation de la liaison à l'albumine sérique humaine. Elle favorise également la captation et l'internalisation des siRNA par le foie, par l'intermédiaire des récepteurs du cholestérol.

Chez la souris, l'administration d'un siRNA spécifique de l'ApoB résulte en une extinction de 60% de l'ARNm correspondant dans le foie, et de 75% dans le jéjunum [244]. De plus, aucun effet non spécifique ni aucune stimulation immunitaire n'ont été observés malgré la forte dose nécessaire à l'activité (50 mg/kg). Pourtant, l'importante liaison cellulaire des conjugués oligonucléotidiques lipophiles interfère de façon non spécifique avec les processus cellulaires naturels, comme le transport des dipeptides [185]. Il est donc nécessaire d'évaluer de façon détaillée la sécurité d'emploi de cette stratégie, potentiellement applicable en clinique.

## **2-Aptamères.**

Les aptamères sont des acides nucléiques particuliers qui se lient spécifiquement et avec une grande affinité à des antigènes cellulaires définis. Ils ont d'ailleurs souvent été vus comme des alternatives non protéiques aux anticorps, possédant en plus une meilleure diffusion tissulaire puisqu'ils sont de plus petite taille (moins de 15 kDa contre 150 kDa).

De petits aptamères (25-35 bases) qui se lient à une grande variété de cibles avec une affinité importante ont déjà été décrits [192]. Il peut également être possible de concevoir des conjugués siRNA-aptamères avec de plus longs brins (45-55 bases), tant que cela reste dans les capacités techniques de synthèse. Avec cette approche, les conjugués thérapeutiques ne sont constitués que d'ARN, ce qui présente l'avantage de limiter les effets secondaires, potentiellement rencontrés avec les agents de transfection.

La conjugaison à des aptamères peut permettre de délivrer des siRNA à des cellules spécifiques. La preuve de ce concept a été apportée *in vitro* et *in vivo*, à l'aide d'aptamères

ciblant des antigènes membranaires spécifiques de la prostate (prostate-specific membrane antigen, PSMA). Ces PSMA sont des récepteurs de surface surexprimés par les cellules cancéreuses prostatiques et l'endothélium vasculaire des tumeurs.

Des aptamères PSMA, conjugués directement à des siRNA [177], ou par l'intermédiaire d'un pont streptavidine [43], ont permis une captation cellulaire spécifique *in vitro* et une inhibition de l'expression de protéines cibles.

*In vivo*, des siRNA dirigés contre des gènes de survie et conjugués à des aptamères PSMA, sont internalisés par les cellules après administration locale, et mènent à une inhibition de l'expression de l'ARNm correspondant, ainsi qu'à une mort cellulaire. Ils ont ainsi permis une régression de la tumeur dans un modèle de cancer de la prostate [177].

Alors que ces conjugués sont utilisables *in vivo* par administration locale, ils présentent encore une demi-vie courte et une clairance plasmatique assez rapide, limitant les possibilités d'une administration systémique.

## **B) Vecteurs cationiques.**

Ces systèmes présentent plusieurs avantages, notamment en comparaison aux vecteurs viraux [77, 162] :

- production à grande échelle et à faibles coûts
- sécurité d'utilisation
- ciblage cellulaire possible
- faible immunogénicité.

Plusieurs types de vecteurs non viraux ont été évalués pour les applications d'extinction par ARNi. On retrouve notamment les lipides cationiques, les polymères cationiques et les peptides de pénétration cellulaire.

### **1-Généralités.**

#### **a) Caractéristiques principales.**

Le point commun de tous ces vecteurs est leur charge positive, qui facilite à la fois la formation de complexes avec les acides nucléiques polyanioniques, et l'interaction avec les membranes cellulaires, chargées négativement.

Ces vecteurs cationiques peuvent former des particules dans lesquelles l'acide nucléique est emprisonné à l'intérieur du corps de la particule, et pas simplement adsorbé à la surface par

interactions électrostatiques. Les complexes sont plus spécifiquement appelés lipoplexes ou polyplexes, selon que le vecteur utilisé est un lipide ou un polymère.

Bien que les mécanismes exacts de délivrance soient variés, ces complexes et particules peuvent, à des degrés divers :

- protéger les siRNA dans le sang
- éviter l'accumulation dans le système réticulo-endothélial
- atteindre les cellules cibles.

Ils permettent d'altérer les propriétés pharmacocinétiques des siRNA, prolongeant ainsi leur demi-vie *in vivo*. Ils permettent notamment de former des structures de taille supérieure à la limite d'excrétion rénale (6 nm, ou 50 kDa).

Il est toutefois à noter que les systèmes de transfection cationiques (notamment les lipides) peuvent augmenter les effets non spécifiques, mais également la stimulation immunitaire des siRNA [117, 164]. La sélection inappropriée d'un vecteur de transfection peut ainsi diminuer l'activité biologique d'extinction, tout en provoquant des effets secondaires indésirables. Leur succès peut également être limité *in vivo* à cause d'une agrégation avec les facteurs circulants du sang ou d'une fixation à la matrice extracellulaire.

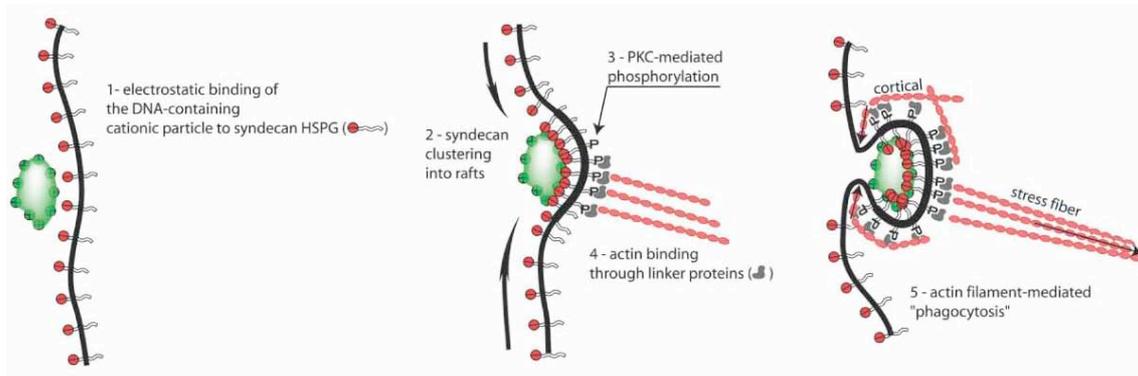
#### b) Internalisation cellulaire.

Pour pénétrer dans les cellules, les particules doivent posséder une charge de surface cationique, afin d'interagir avec les syndécans, des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) anioniques responsables de leur internalisation [134].

Les syndécans sont des protéines transmembranaires présentes sur toutes les cellules adhérentes. Leur fonction cellulaire primaire est d'agir comme des molécules d'adhésion. En effet, elles lient les protéines de la matrice extracellulaire et contribuent à coordonner les processus cellulaires de migration, d'adhésion et d'organisation du cytosquelette. La liaison à ces récepteurs semble également être un moyen général de macropinocytose, utilisé pour capter diverses entités telles que les chylomicrons, des pathogènes et/ou les particules formées par les vecteurs cationiques.

L'internalisation des complexes cationiques par l'intermédiaire des syndécans se déroule en trois étapes (figure 21). Dans un premier temps, les particules cationiques se lient aux syndécans de façon électrostatique. Ceci déclenche le regroupement des HSPG au niveau de radeaux lipidiques, riches en cholestérol. Il en résulte une activation de la protéine kinase C,

qui permet la liaison de filaments d'actine au domaine intracellulaire des syndécanes, par l'intermédiaire de protéines adaptatrices. Ces filaments permettent ensuite l'invagination de la membrane cellulaire puis l'englobement des particules cationiques dans une vacuole intracytoplasmique.



**Figure 21 : Mécanisme de pénétration cellulaire des complexes cationiques. (d'après Kopatz, 2004)**

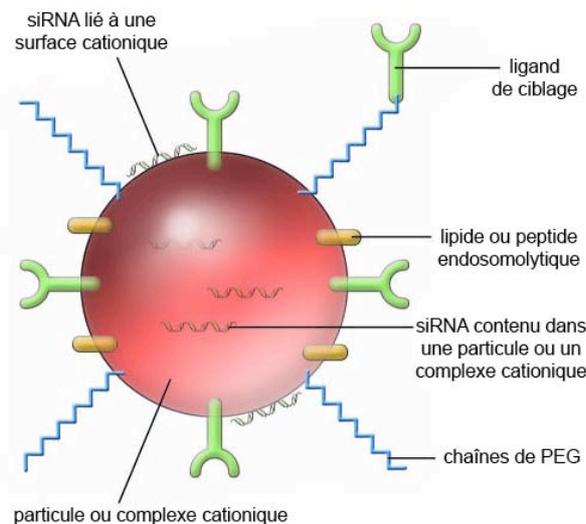
Les particules cationiques se retrouvent séquestrées dans des endosomes, et doivent réussir à s'en échapper pour que les acides nucléiques exercent leur effet biologique. Cette sortie des vésicules d'endocytose peut être facilitée par l'ajout de molécules déstabilisant les membranes, ou grâce à une propriété intrinsèque de pouvoir tampon des vecteurs cationiques. *Ces points seront développés dans les paragraphes suivants.*

### c) Ligands d'aide à la transfection.

Des modifications des particules peuvent être envisagées afin d'améliorer leurs propriétés de transfection (figure 22).

Il est par exemple possible d'ajouter :

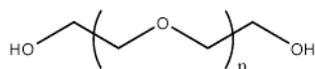
- du polyéthylène glycol (PEG) pour stabiliser les particules et prolonger leur demi-vie plasmatique
- un ligand de ciblage, tel qu'un anticorps spécifique d'un récepteur ou d'un antigène de surface, pour permettre une atteinte tissulaire ou cellulaire particulière
- des molécules facilitant le relargage cytoplasmique depuis les endosomes.



**Figure 22 :** Description schématique des composants structuraux de transfection. (d'après Akhtar, 2007)

### c1. Amélioration des propriétés pharmacocinétiques.

Les particules obtenues avec des vecteurs cationiques, compte tenu de leur charge de surface positive, peuvent interagir de façon électrostatique avec les protéines plasmatiques circulantes, formant des agrégats qui vont être captés puis éliminés par le système réticulo-endothélial. Pour éviter toute interaction non spécifique et une clairance trop rapide, il est possible de diminuer la formation d'agrégats et les problèmes consécutifs en masquant la charge de surface de ces particules par l'utilisation de polymères hydrophiles [206]. A cet effet, plusieurs types de molécules sont disponibles (notamment des polysaccharides), mais l'approche la plus courante est l'utilisation de PEG (figure 23).



**Figure 23 :** Formule du PEG.

### c2. Ciblage cellulaire.

Il existe des récepteurs de surface, spécifiques d'un tissu ou d'une pathologie, qui peuvent être utilisés pour un ciblage sélectif.

Des peptides RGD (Arg-Gly-Asp) ont été utilisés comme motif de ciblage des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  ou  $\alpha_5\beta_1$ , exprimées par les tissus vasculaires tumoraux [229]. Les intégrines sont des molécules qui lient le cytosquelette à la matrice extracellulaire, et qui peuvent capter diverses entités par une endocytose médiée par la clathrine. On les retrouve essentiellement au niveau des cellules endothéliales, ce qui explique qu'on les retrouve en grande quantité au niveau des tumeurs, où la néoangiogenèse est importante.

La transferrine conjuguée à des polycations est connue depuis 15 ans pour faciliter la transfection de l'ADN [279]. Le récepteur spécifique de cette molécule est présent à la surface de toutes les cellules de l'organisme et permet le passage transmembranaire du fer lié à la transferrine. Le nombre de récepteurs situés sur chaque cellule est directement proportionnel aux besoins en fer, et ce sont les cellules de la moelle osseuse qui en expriment le plus, environ 70 à 80% de la totalité. Les cellules tumorales peuvent également en exprimer de grandes quantités, permettant alors un ciblage spécifique de complexes cationiques conjugués à de la transferrine, ainsi que leur entrée cellulaire médiée par ces récepteurs.

Le ciblage cellulaire de particules de transfection est également proposé par l'intermédiaire des récepteurs de l'acide folique, via un ligand folate [110]. Ceux-ci sont surexprimés au niveau des cellules cancéreuses, puisque l'acide folique est essentiel pour le développement et la croissance cellulaires.

D'autres ligands de ciblage ont été développés pour permettre de délivrer des siRNA à des tissus ou cellules spécifiques [179], mais nous ne les détaillerons pas ici. On trouve par exemple des anticorps ou des sucres, tels que le galactose ou le mannose.

### *c3.Sortie des endosomes.*

Une fois à l'intérieur des cellules, les siRNA doivent s'échapper des compartiments cellulaires dans lesquels ils sont enfermés, tels que les endosomes ou les lysosomes, afin qu'ils puissent exercer leur activité biologique dans le cytoplasme.

On peut recourir à des lipides fusogéniques comme la DOPE (L- $\alpha$  dioleoyl phosphatidyl éthanolamine) [98]. Cette molécule facilite le relargage cytoplasmique [300] par l'intermédiaire de la fusion et/ou de la rupture de la membrane endosomale, par formation de structures lipidiques hexagonales (capacité de transition de monocouche de phase  $L_{\alpha}$  en phase inversée  $H_{II}$  ; phénomène dépendant des conditions de concentration, pH et température). Cette molécule est un lipide helper puisqu'elle est inactive par elle-même en tant qu'agent de transfection, probablement à cause de son incapacité à interagir spontanément avec l'ADN [72].

On peut également utiliser des peptides sensibles au pH [278] tels que la poly-histidine-lysine qui permet de déstabiliser la membrane des endosomes. Cette approche a notamment été exploitée pour transférer des siRNA *in vitro* [161].

## **2-Systèmes lipidiques.**

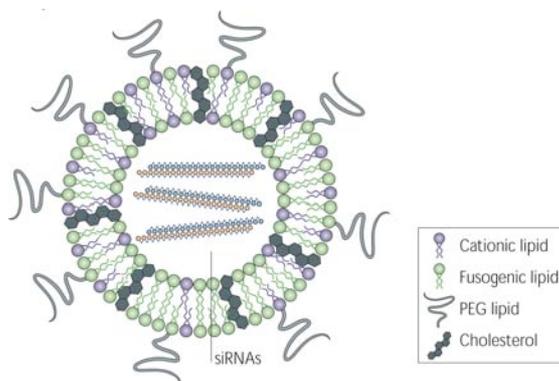
Les liposomes et les lipidiques cationiques sont les systèmes de délivrance les plus utilisés pour obtenir un effet biologique sur culture cellulaire. Grâce à leur charge positive, ces systèmes ont une bonne affinité pour la membrane plasmique chargée négativement, et permettent une entrée cellulaire par endocytose.

Il est nécessaire d'optimiser les conditions d'utilisation de ces systèmes, notamment au niveau du rapport de charge entre le lipide cationique et l'acide nucléique anionique. L'efficacité de transfection dépend également du type et de la nature du lipide cationique, du type cellulaire, de la chimie des oligonucléotides, et même de la formation des lipoplexes [245].

### **a) Liposomes.**

Les liposomes sont composés d'un compartiment aqueux entouré d'une bicouche lipidique, constitué de différents types de lipides (figure 24). Ils sont largement utilisés comme système de délivrance des acides nucléiques puisqu'ils permettent la protection et la captation cellulaire de ces molécules. De nombreuses équipes ont travaillé sur les formulations liposomales, et depuis la fin des années 1990, elles ont été approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) pour la délivrance de petites molécules médicamenteuses [181].

Les liposomes peuvent être modifiés avec des ligands tels que des folates ou des petits peptides qui aident à la délivrance et au ciblage tissulaire ou cellulaire [62]. Par l'intermédiaire de l'utilisation de substituants neutres tels que du PEG, les liposomes peuvent être stabilisés et rendus plus furtifs, pour diminuer leur clairance et améliorer leur pharmacocinétique [206]. Il est intéressant de noter que des liposomes PEGylés ont été cliniquement approuvés comme système de délivrance de la doxorubicine, et représentent donc une possibilité sérieuse de transfection des siRNA chez l'Homme.



**Figure 24 : Formulation liposomale pour la transfection des siRNA.**  
(d'après De Fougerolles, 2007)

Bien que les liposomes neutres aient été utilisés avec succès pour transférer des siRNA *in vivo* [92], les liposomes cationiques sont plus couramment utilisés.

Des liposomes cationiques, formés de lipides cationiques, de lipides fusogènes et modifiés par du PEG, ont ainsi été utilisés. Après administration systémique chez des souris et des primates non humains, les siRNA contenus dans ces systèmes se sont révélés capables d'éteindre le gène de l'ApoB au niveau du foie [306]. Le même type de liposomes a été utilisé avec succès par Morrissey et son équipe pour inhiber le virus de l'hépatite B chez des souris [186].

#### b) Lipides cationiques.

Les lipides cationiques sont constitués d'une tête chargée positivement, reliée à une ou plusieurs queues hydrophobes. Les lipides de première génération possèdent une tête monocationique tandis que ceux de deuxième génération, les lipopolyamines, ont une tête polycationique. Ils permettent de transférer *in vitro* des types cellulaires variés avec une grande efficacité, une faible toxicité, tout cela de façon simple et reproductible [79]. Les particules formées avec ces lipides diffèrent des liposomes. Il s'agit de structures multilamellaires [217] ne comportant pas de compartiment central aqueux.

Les lipides cationiques sont les agents de délivrance les plus couramment utilisés pour la transfection des siRNA sur culture tissulaire [81], ils représentent même la méthode de choix dans ce cas. Pourtant, leur utilisation en clinique peut être limitée à cause notamment de considérations toxicologiques. La toxicité varie avec la composition chimique précise des lipides employés, de la dose, et de différents autres facteurs [22].

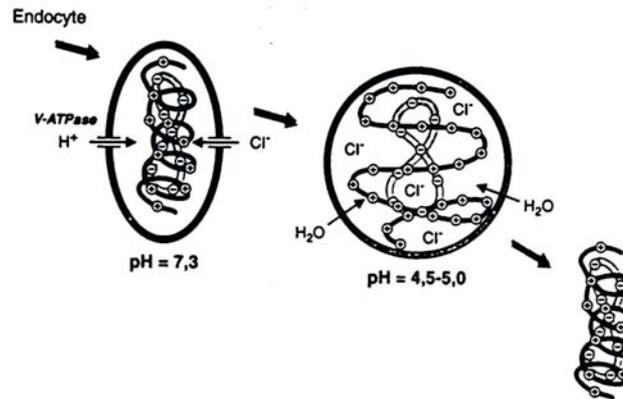
La plupart des effets toxiques des lipides cationiques *in vivo* provient d'interactions électrostatiques. Ils peuvent interagir avec les protéines sériques circulantes, les lipoprotéines, ou encore les glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire, ce qui mène à une agrégation. Les conséquences de ce phénomène peuvent être une obstruction des capillaires sanguins, mais également une clairance plasmatique rapide et une accumulation dans le système réticulo-endothélial. Lorsque les lipides interagissent avec les protéines du complément, ils déclenchent la libération de nombreuses cytokines menant à une réponse inflammatoire. A très haute dose, les lipides peuvent entraîner une lymphopénie, une thrombocytopénie et une nécrose hépatique [266].

De plus, il a été montré *in vitro* que certaines formulations cationiques augmentent la réponse immunitaire des siRNA [164] et/ou sont responsables de modifications de l'expression génique globale [202].

Malgré ces inconvénients, les molécules lipidiques sont largement évaluées, et il y a un nombre croissant d'études *in vivo* rapportant la délivrance efficace de siRNA avec ces systèmes. Bien que la voie IV ait été utilisée pour l'administration systémique des lipides [15], elle favorise leur toxicité et c'est donc l'injection IP qui est souvent privilégiée [75, 243, 275]. A côté de cela, on retrouve aussi des études de transfection de siRNA par administration locale, soit par injection directe dans le système nerveux central [98, 163], soit en application topique [166, 208].

### **3-Polymères cationiques.**

Les polymères cationiques, linéaires ou branchés, lient et condensent facilement l'ADN. Ils sont très largement utilisés pour la transfection de gènes ou d'oligonucléotides.



**Figure 25 : Mécanisme de l'éponge à protons.** (d'après Behr, 1997)

L'entrée de  $H^+$  et de  $Cl^-$  dans l'endosome s'accompagne d'une entrée d'eau pour stabiliser la pression osmotique, ce qui aboutit au gonflement puis à la rupture de l'endosome.

A quelques exceptions près (notamment la polylysine), la grande densité de charge des polymères leur permet de tamponner le pH endosomal. Cela a pour conséquence d'augmenter l'entrée de protons et d'eau dans les endosomes, dans lesquels les polyplexes sont séquestrés. Ce phénomène aboutit à la rupture de la vésicule et à la libération des acides nucléiques dans le cytoplasme [25]. C'est ce que l'on appelle l'effet d'éponge à protons (figure 25).

#### a) PEI.

Parmi les polymères cationiques disponibles, on trouve la polyéthylèneimine (PEI), utilisée depuis de nombreuses années pour faciliter la délivrance des acides nucléiques [84]. Ce composé a été identifié il y a plus de 60 ans, et son innocuité a largement été démontrée au

travers de ces utilisations variées, par exemple dans les shampoings, les procédés de purification d'eau ou encore d'extraction de minerais [219]. Ce polymère existe sous forme linéaire ou branchée, et à différents poids moléculaires, allant de 1kDa à plus de 1000kDa. En général, les PEI de faible poids moléculaire ( $\leq 25$ kDa) sont de meilleurs agents de transfection que ceux de plus haut poids moléculaire, car ces derniers ont tendance à être toxiques [74].

La structure de cette molécule (répétition du motif éthylène imine -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-) explique son intérêt en tant que vecteur synthétique : tous les trois atomes du squelette se trouve un atome d'azote qui peut être protoné. La PEI possède ainsi une forte densité de charges cationiques, responsable de ses propriétés fonctionnelles. D'une part, elle est capable de condenser les acides nucléiques, par l'intermédiaire des fortes interactions ioniques entre les charges positives des amines primaires, et les groupes phosphates anioniques des nucléotides. D'autre part, cette molécule est capable de tamponner très efficacement l'acidité des endosomes [298]. La protonation globale de la PEI passe de 20 à 45% des amines lorsque le pH varie entre des valeurs de 7 et 5 [249].

La PEI est le polymère cationique possédant la plus grande densité de charges cationiques, et elle a régulièrement été utilisée avec succès pour le transfert d'ADN *in vitro* et *in vivo* [13, 32]. Cette molécule fait partie des vecteurs les plus efficaces *in vivo*, et des essais cliniques de thérapie génique utilisant la PEI pour le transfert d'ADN sont en cours, notamment dans le traitement de cancers de la vessie [199]. De ce fait, la PEI semble être un système de transfection prometteur pour une utilisation *in vivo* des siRNA.

La PEI a ainsi été utilisée en 2004, pour délivrer des siRNA dans un modèle murin d'infection par l'influenza virus [78]. Suite à une administration IV, les siRNA contenus dans les polyplexes ont permis de contrôler l'expression du virus au niveau pulmonaire.

Dans un modèle murin de tumeur sous-cutanée, l'administration intrapéritonéale de siRNA, complexés avec de la PEI linéaire, mène à leur délivrance au niveau des tumeurs, résultant en une diminution de croissance tumorale [268].

Les études ci-dessus rapportent l'efficacité de la PEI pour délivrer des siRNA *in vivo*, mais il existe également des études dans lesquelles ce polymère se révèle inefficace [98]. A cause de ces performances variables, l'utilisation de la PEI n'a pas été généralisée à la transfection des

siRNA [22]. Toutefois, différentes études *in vivo* indiquent un effet bénéfique de la PEI dans des formulations plus complexes.

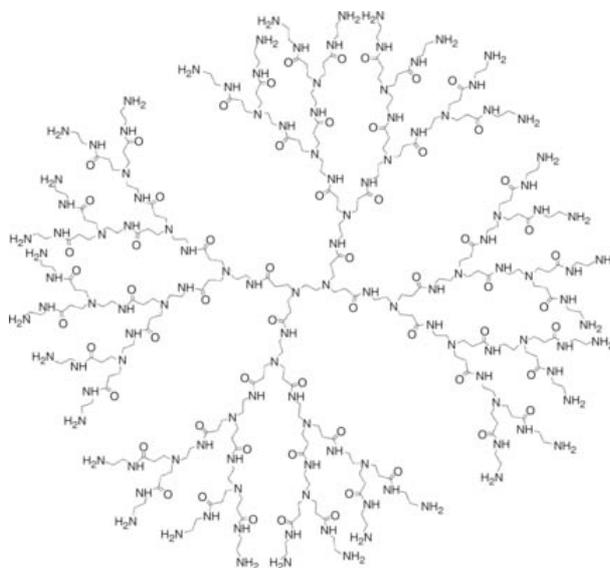
Différentes sortes de modifications ont été apportées à la PEI pour lui permettre de transfecter efficacement des siRNA *in vivo*. Par exemple, des nanoparticules à base de PEI PEGylée, portant un peptide Arg-Gly-Asp pour cibler les intégrines, ont été utilisées sur un modèle murin de tumeur sous-cutanée [229]. Leur administration IV résulte en une captation sélective des siRNA (anti-VEGF) au niveau de la tumeur, menant alors à une réduction de l'angiogenèse et à une inhibition de la croissance tumorale.

La conjugaison de transferrine à des complexes cyclodextrine/PEI/adamantine/PEG a également été explorée. Cette construction améliore le ciblage de tumeurs et elle a été utilisée pour transfecter des siRNA *in vivo* chez la souris [108].

#### b) Dendrimères.

Les dendrimères représentent une autre classe de polymères fréquemment utilisés pour la transfection d'acides nucléiques [262, 292].

**Figure 26 :** Structure des dendrimères.



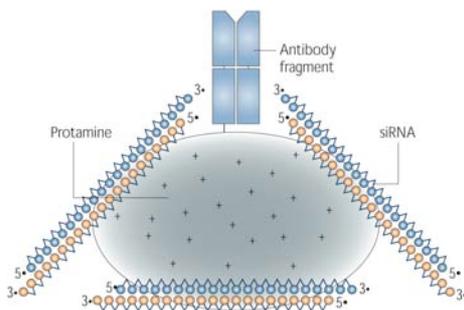
Il s'agit de polyamidoamines (PAMAM), des macromolécules tridimensionnelles quasi-sphériques, de structure branchée, et qui portent un grand nombre de groupes amines (figure 26). Ces amines ne sont pas toutes protonées à pH physiologique, d'où un pouvoir tampon potentiel [219]. Ces systèmes peuvent être synthétisés de façon à obtenir un poids moléculaire, une forme et une taille précis.

Ces vecteurs ont été utilisés pour délivrer des siRNA *in vivo* [19] mais ils ont principalement été étudiés *in vitro* [119, 305]. En effet, ces molécules présente une certaine toxicité non spécifique, ralentissant leur utilisation *in vivo* [105].

### c) Autres polymères.

#### c1. Protamine.

La protamine, polyamine cationique, peut complexer et condenser les acides nucléiques et a donc été utilisée pour la transfection d'ADN et d'oligonucléotides [273]. Elle peut être conjuguée à différentes molécules qui améliorent ses performances. La protamine a par exemple été conjuguée à des fragments Fab d'anticorps pour cibler sélectivement certaines cellules (figure 27), et cette approche a été utilisée avec succès pour délivrer des siRNA en IV chez la souris [211, 241].



**Figure 27 : Représentation de la liaison non covalente de siRNA avec des protéines de fusion anticorps-protamine.** (d'après De Fougerolles, 2007)

#### c2. Atélocollagène.

L'atélocollagène est une très grosse protéine de 300 kDa, dérivant de collagène de type I, issu de derme de veau. Lorsqu'elle est complexée avec les siRNA, cette polyamine cationique améliore de trois fois la demi-vie des siRNA et augmente leur captation cellulaire [182].

*In vivo*, ce polymère s'est avéré capable de transférer efficacement des siRNA ciblant le VEGF dans un modèle de cancer de la prostate [254], des métastases osseuses [255] et un modèle de cancer des testicules [182].

#### c3. Chitosan.

Le chitosan, polysaccharide cationique constitué de résidus glucosamines, a été régulièrement évalué en tant que système de transfection des acides nucléiques, puisqu'il apparaît être un vecteur biocompatible, simple à utiliser et peu coûteux [135]. Des particules à base de ce

polymère se sont révélées efficaces pour la délivrance de siRNA *in vitro* et *in vivo* [54, 106, 121, 159].

#### *c4. Cyclodextrine.*

Un polymère cyclodextrine, modifié par un ligand transferrine, a été utilisé pour délivrer par IV des siRNA dans un modèle murin de sarcome d'Ewing [107]. Ce type de système de transfection a également été utilisé en IV chez des primates non humains, démontrant la très bonne tolérance à ce vecteur [100].

### **4-Peptides cationiques.**

Certaines séquences peptidiques, naturelles ou synthétiques, ont la capacité d'entrer dans les cellules [167]. Ces motifs particuliers, comportant au maximum 30 acides aminés et possédant une charge globale positive, ont été dénommés « peptides de pénétration cellulaire » (cell-penetrating peptides ; CPP). Le mécanisme du passage de la membrane cellulaire par les CPP est encore imprécis. En effet, il semblait initialement que leur mode d'entrée était indépendant des voies d'endocytose [56, 250], mais des études ultérieures indiquent maintenant le contraire [61, 222].

Ces peptides ont largement été utilisés *in vitro* ou *in vivo* pour délivrer différentes molécules dans les cellules, dont des acides nucléiques [65]. Ils ont tout naturellement été appliqués à la délivrance de siRNA, principalement *in vitro*, suivant deux stratégies :

- formation de complexes siRNA/CPP par interactions électrostatiques
- conjugaison des CPP aux siRNA, de façon covalente.

Il a ainsi été montré que des peptides MPG [236], penetratin [51] ou cholesteryl oligoarginine [130] permettaient, par formation de complexes, la délivrance de siRNA *in vitro*. Le peptide cholesteryl oligoargine a également été utilisé *in vivo* par administration locale à un modèle murin, permettant la régression de tumeurs par l'intermédiaire de siRNA ciblant le VEGF [130].

La conjugaison des siRNA à des CPP, tels que la penetratin ou le transportan, représente aussi une méthode assez efficace de délivrance des siRNA *in vitro* [188]. Les deux entités sont reliées par l'intermédiaire d'une liaison labile, permettant la libération des siRNA une fois à l'intérieur des cellules. Bien que moins facile à mettre en œuvre, cette technique de conjugaison est intéressante puisqu'elle nécessite l'utilisation de moins de peptides que pour

la formation de complexes. De plus, les conjugués oligonucléotides-CPP offrent l'avantage d'être des molécules, et non des particules, ce qui peut faciliter la transfection *in vivo*. Une étude récente a d'ailleurs montré pour la première fois que les conjugués siRNA-peptides pouvaient passer la barrière hémato-encéphalique après administration systémique [138].

## V. RECAPITULATIF.

Avant de choisir une méthode de transfection, il faut prêter attention au contexte cellulaire. La technique employée diffèrera selon que les cellules sont accessibles par une administration locale ou systémique, cette dernière imposant aux vecteurs de transfection des caractéristiques physiques et/ou fonctionnelles plus drastiques. De même, si les cellules cibles sont connues pour être réfractaires à la transfection (entre autres les cellules quiescentes ou se divisant peu), il faudra utiliser une méthode adaptée.

Il existe de nombreuses méthodes de transfection (figure 28), d'efficacité et de complexité variables, aucune ne couvrant tous les types cellulaires et toutes les conditions environnementales [23]. Le choix de la technique la plus appropriée dépend du type d'application, mais également des avantages et des inconvénients de ces différents systèmes, sachant également que certaines méthodes sont préférentiellement utilisées.

		facilité d'emploi	efficacité	utilisation systémique	cellules cibles	caractéristique particulière	limitations pour une utilisation thérapeutique
METHODES PHYSIQUES	électroporation	+/-	+	-	tissus accessibles à l'implantation d'électrodes		invasif mortalité cellulaire non négligeable
	injection hydrodynamique	+/-	+	-	muscles squelettiques		dommages tissulaires ou cellulaires
METHODES VIRALES	retrovirus, lentivirus, adénovirus, AAV, baculovirus	+/-	+	+/-	toutes sauf retrovirus (cellules en division uniquement)	expression stable (sauf adénovirus)	problèmes de sécurité d'emploi production compliquée et coûteuse limitations spécifiques selon les virus
METHODES NON VIRALES	conjugaison	+/-	+	-	dépend du conjugué		préparation des conjugués clairance relativement rapide
	lipides cationiques	+	+	+/-	toutes	greffage de ligands possible	toxicité, effets secondaires
	PEI	+	+/-	+	toutes	fort pouvoir tampon versatilité	performances variables
	peptides cationiques	+	+/-	+	toutes	pénétration facilitée	assez peu d'études complètes <i>in vivo</i>

**Figure 28 :** Principales méthodes de transfection applicables à la délivrance des siRNA *in vivo*.

CHAPITRE 6  
*Essais cliniques*

## I. GENERALITES.

### A) Phases d'essais cliniques.

Ce n'est qu'après les multiples étapes de développement pré-clinique, et à condition que les résultats de l'expérimentation animale aient été jugés prometteurs et non dangereux, que les premiers essais thérapeutiques sur l'homme peuvent être réalisés. On parle alors de développement clinique [146]. Les essais cliniques sont une étape obligatoire et systématique du développement d'un médicament. Ils permettent de préciser l'effet d'un traitement chez l'homme, d'en déterminer l'efficacité ainsi que les éventuels effets indésirables. On distingue 4 phases dans les essais cliniques, chacune étant considérée comme un essai clinique séparé pour un même médicament en développement [287].

Lors de la phase I, les essais sont généralement réalisés sur un petit groupe de volontaires sains (20 à 80). Toutefois, dans certains cas, ces études sont menées sur de vrais patients, notamment lors d'essais cliniques concernant les anti-cancéreux ou les médicaments contre le VIH. Ces essais ont lieu dans des centres spécialisés qui ont reçu un agrément de la part des autorités de santé. Ces études ont deux objectifs majeurs :

- s'assurer que les résultats de toxicité obtenus lors du développement pré-clinique sont comparables à ceux obtenus chez l'Homme. Cela permet de déterminer la dose maximale de médicament tolérée.
- mesurer, via des études de pharmacocinétique, le devenir du médicament dans l'organisme en fonction de son mode d'administration (absorption, distribution, métabolisme, excrétion).

Les essais de phase II ont pour objectif de déterminer la posologie optimale du produit en terme d'efficacité et de tolérance sur une population limitée et homogène de patients (quelques centaines). Les interactions médicamenteuses ainsi que la pharmacocinétique font parfois l'objet d'études dès cette phase.

Les essais de phase III, de plus grande envergure, sont conduits sur plusieurs milliers de patients représentatifs de la population de malades à laquelle le traitement est destiné. Ces essais visent à démontrer l'intérêt thérapeutique du médicament et à en évaluer le rapport bénéfice/risque.

Il s'agit d'essais comparatifs au cours desquels le médicament en développement est comparé à un traitement efficace déjà commercialisé ou, dans certains cas, à un placebo, c'est-à-dire un traitement sans activité pharmacologique. Cette comparaison se fait le plus souvent en double aveugle, c'est-à-dire que les traitements sont attribués de manière aléatoire sans que le patient et le médecin chargé du suivi ne soient informés de l'attribution dont ils font l'objet.

C'est à l'issue de la phase III que les résultats peuvent être soumis aux autorités de santé pour l'autorisation de commercialisation. En Europe, l'autorisation de mise sur le marché est accordée par l'Agence Européenne des Médicaments (European Medicines Agency ou EMEA), tandis qu'aux Etats-Unis, c'est la Food and Drug Administration (FDA) qui en est chargée.

Les essais de phase IV sont menés une fois que le médicament est commercialisé, donc ils concernent un nombre de patients souvent très important (jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de personnes). Ils permettent d'approfondir la connaissance du médicament dans les conditions réelles d'utilisation, et d'évaluer sa tolérance à grande échelle. La pharmacovigilance permet ainsi de détecter des effets indésirables très rares qui n'ont pas pu être mis en évidence lors des autres phases d'essai. La découverte d'effets secondaires nuisibles peut mener à des restrictions d'usage du médicament commercialisé, voire à un arrêt de commercialisation.

Les essais cliniques peuvent être publics ou privés, toutefois, 71% des études cliniques sont lancées à l'initiative des entreprises du médicament. Il est à noter qu'il s'écoule plusieurs années entre le début des essais thérapeutiques et l'autorisation de commercialisation d'un nouveau médicament. Il existe plusieurs raisons à cela :

- pour certaines pathologies, notamment les maladies chroniques, il peut être nécessaire d'attendre plusieurs mois avant de pouvoir observer un effet thérapeutique
- il peut être long d'identifier les patients présentant tous les critères d'inclusion indispensables pour participer à un essai clinique défini, tout en respectant les critères d'exclusion établis
- obtenir le consentement des patients que l'on souhaite recruter, ou de leur famille, peut nécessiter du temps
- il peut également être long de réunir un nombre suffisant de patients afin de constituer un échantillon statistique représentatif.

## B) L'essor de l'ARN interférence.

Depuis sa découverte en 1998 et l'identification des différents éléments impliqués, le domaine de l'ARNi est en pleine expansion. Compte tenu de la relative jeunesse de l'interférence par ARN, il y a déjà un nombre remarquable d'études *in vivo* publiées pour décrire le développement pré-clinique de siRNA thérapeutiques, ou des méthodes basées sur les siRNA pour valider des cibles thérapeutiques pour de petites molécules [22, 127].

Les grandes sociétés pharmaceutiques et le monde académique se sont empressés d'exploiter les prouesses de l'ARN interférence pour accélérer la découverte et la validation de nouvelles molécules médicamenteuses, tandis que les entreprises de biotechnologies ont préféré placer leurs espoirs dans le développement de thérapeutiques innovantes. Cet essor de l'ARN interférence a d'ailleurs aboutit à la création de nouvelles « start-up » dans le domaine (Alnylam en 2002), mais également à des changements d'orientation de certaines entreprises auparavant spécialisées dans la recherche sur les ribozymes ou la stratégie antisens (Sirna Therapeutics en 2003). Par la suite, certaines grandes sociétés pharmaceutiques ont rejoint ces entreprises de biotechnologies en établissant des collaborations pour le développement de nouvelles thérapeutiques (Novartis, Merck, ...). Plus de 30 entreprises pharmaceutiques ou biotechnologiques ont déclaré avoir un intérêt ou des programmes de développement en cours concernant des thérapeutiques par ARN interférence [22].

Société	Indication	Produit	Phase d'essai	Voie d'administration
OPKO Health	DMLA œdème maculaire	Cand 5	III II	injection intraoculaire (siRNA nus)
Sirna Therapeutics (Merck)	DMLA hépatite C	Sirna 027 Sirna 034	II I	injection intraoculaire injection IV
Alnylam	virus respiratoire syncytial	ALN-RSV01	II	inhalation (siRNA nus)
Quark Pharmaceuticals	DMLA, œdème maculaire insuffisance rénale	RTP801-i-14 AKI-5	II I	injection intraoculaire injection IV
Benitec	HIV hépatite C	BLT-HIV BLT-HCV	I I	vecteur lentiviral (ex vivo) injection IV
Nucleonics	hépatite B	NucB-1000	I	injection IV
Transderm	pachyonychie congénitale	TD-101	I	injection intradermique

**Figure 29 : Principaux essais cliniques en cours dans le domaine de l'ARN interférence.**

L'évolution dans le développement de nouvelles thérapeutiques a été rapide, puisque la technologie d'interférence par ARN est passée, en à peine 6 ans, des essais *in vitro* sur culture cellulaire au stade des essais cliniques sur l'Homme ; le premier essai clinique a été débuté fin

2004, chez des patients souffrant de DMLA. Cette progression rapide est sans précédent en médecine, et prouve le fabuleux potentiel de l'ARNi en thérapeutique.

Toutefois, compte tenu des difficultés de développement de méthodes de transfection efficaces, les premiers essais (figure 29) ont surtout concerné des pathologies pour lesquelles l'administration de siRNA est possible et aisée. Ainsi, on retrouve des traitements pour les pathologies oculaires, l'œil étant facilement accessible à des injections locales, des pathologies respiratoires, les poumons pouvant être atteints par les voies aériennes supérieures. De même, les maladies hépatiques font l'objet d'essais thérapeutiques, puisque le foie est un organe naturellement impliqué dans la biodistribution des siRNA.

## **II. TRAITEMENT DES PATHOLOGIES OCULAIRES.**

Historiquement, les indications ophtalmiques ont toujours été très attrayantes pour les thérapeutiques basées sur l'utilisation d'oligonucléotides. Les seuls médicaments de ce type approuvés par la FDA concernent d'ailleurs l'œil : le fomivirsen (Vitravene), utilisé pour traiter la rétinite liée au cytomégalo virus chez les malades du VIH, et Macugen, utilisé pour le traitement de la DMLA [53, 139].

Cet attrait provient du fait que l'œil est un des tissus les plus accessibles dans l'organisme, permettant une administration locale de siRNA. En effet, l'injection directe dans la cavité oculaire permet de cibler efficacement la rétine. Un autre avantage dans le traitement des pathologies oculaires par des oligonucléotides est lié au fait que le compartiment oculaire est relativement pauvre en nucléases, en comparaison du sérum.

### **A) Pathologies.**

#### **1-Dégénérescence maculaire liée à l'âge.**

La DMLA est la principale cause de cécité non corrigable de la personne âgée dans les pays industrialisés. En l'absence d'une étiologie connue, sa définition est clinique et large : il s'agit de l'ensemble des lésions de la région maculaire, dégénératives, survenant après l'âge de 50 ans, dans un œil auparavant normal, et entraînant une altération de la fonction rétinienne maculaire, donc de la vision centrale. Cliniquement, on distingue deux formes de DMLA :

- une forme atrophique, non néovasculaire, ou « sèche » : 80% des cas
- une forme exsudative, néovasculaire, ou « humide » : 20% des cas.

a) Epidémiologie.

La prévalence globale de la DMLA augmente progressivement avec l'âge. Elle est d'environ 1 à 2% entre 50 et 65 ans, 10% entre 65 et 75 ans, et 25% entre 75 et 85 ans. Du fait du vieillissement de la population, sa prévalence pourrait augmenter de près de 50% d'ici 2020.

Hormis l'âge, les facteurs de risques de présenter une DMLA comprennent le tabagisme, le surpoids, ainsi que probablement l'hypertension artérielle, la couleur claire de l'iris, les antécédents d'accidents coronariens et l'exposition importante à la lumière. Les facteurs génétiques jouent également un rôle dans la survenue de la DMLA puisque sa fréquence augmente dans la fratrie d'un patient atteint.

Cette maladie est plus fréquente chez les patients de couleur blanche. Elle est deux fois plus rare chez les patients de couleur noire, avec une probabilité intermédiaire chez les Asiatiques et les Hispaniques. L'incidence au Japon est toutefois semblable à celle des pays européens.

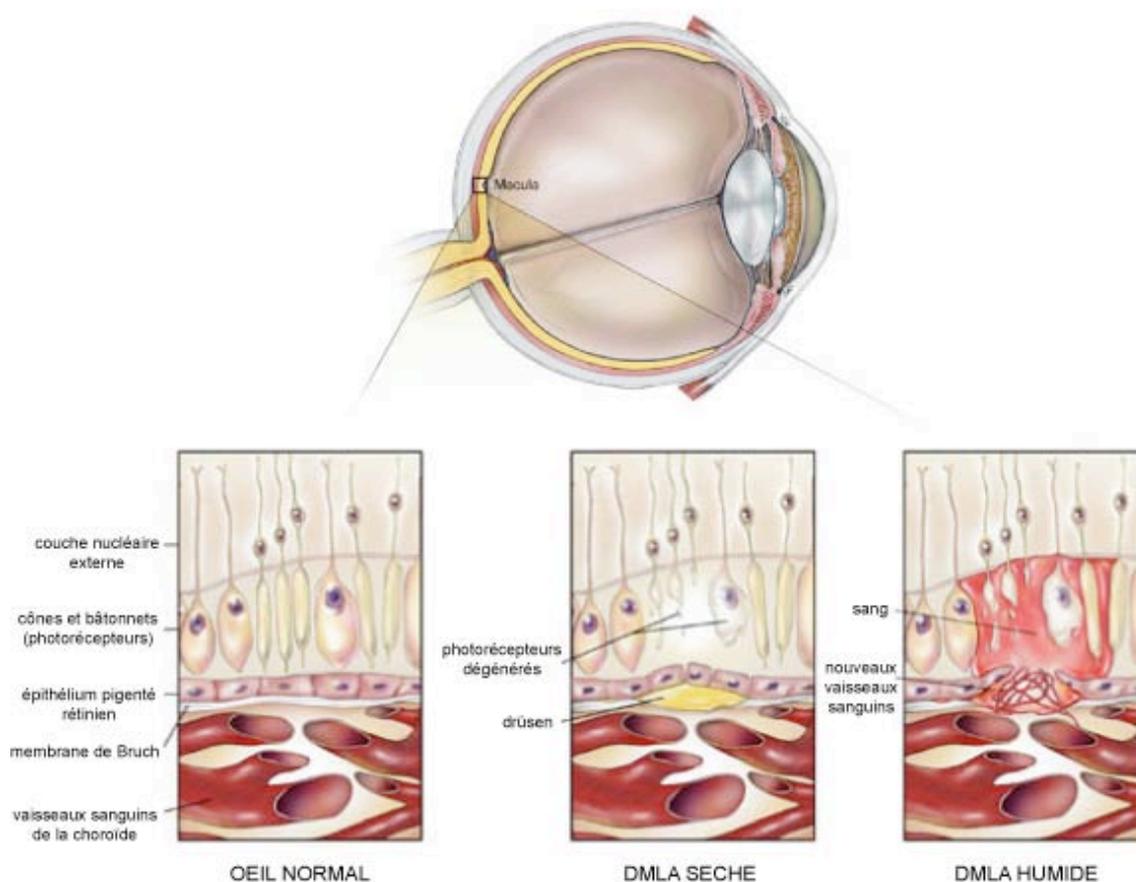
b) Physiopathologie.

Toute DMLA débute par la forme sèche, qui est la moins grave mais la plus fréquente. Les malades doivent régulièrement contrôler leur vision centrale car cette forme peut évoluer, chez environ une personne sur dix, vers la forme humide, entraînant des complications fonctionnelles plus sévères.

Le premier signe d'une DMLA est l'apparition de précurseurs que sont les drüsens, de petits dépôts jaunes situés sous la rétine. Ils font partie du processus normal du vieillissement oculaire et sont dus à l'accumulation de résidus de la phagocytose des photorécepteurs par les cellules de l'épithélium pigmentaire. En temps normal, les cellules sensibles à la lumière, situées dans la macula, se renouvellent constamment et les cellules mortes sont alors évacuées sous la rétine. Chez les personnes atteintes de DMLA, ces cellules mortes s'accumulent et sont peu à peu remplacées par du tissu cicatriciel. Compte tenu de la barrière ainsi formée, les vaisseaux sanguins parviennent plus difficilement à irriguer la rétine (figure 30).

Ce phénomène mène à l'amincissement et à l'assèchement de la macula, ce qui provoque la perte de la fonction visuelle, dont le degré est directement relié à l'importance et à la localisation de l'atrophie de la rétine.

La forme sèche de la DMLA évolue inexorablement, mais de façon très progressive, vers une extension des lésions qui vont englober la fovéa et entraîner une baisse d'acuité visuelle sévère avec scotome central.



**Figure 30 :** Physiopathologie de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

La forme exsudative est en quelque sorte une aggravation de la forme sèche. Elle est liée à l'apparition de néovaisseaux choroïdiens, soit sous-épithéliaux (se développant sous l'épithélium pigmentaire) et dits « occultes », soit sus-épithéliaux et donc dits « visibles ».

On ne comprend pas bien ce qui provoque la formation de ces vaisseaux sanguins, mais le VEGF en est le stimulus central. L'accumulation de cellules mortes pourrait avoir pour conséquence d'interrompre le flux sanguin dans la choroïde et pour compenser, de nouveaux vaisseaux se formeraient (figure 30).

Cette néovascularisation choroïdienne entraîne un décollement exsudatif de la rétine ainsi que des hémorragies sous-rétiniennes. En effet, les nouveaux vaisseaux sanguins, fragiles, peuvent laisser s'échapper des fluides ou du sang, brouillant ou déformant la vision mais pouvant également endommager davantage la macula. Plus ces vaisseaux vont croître ou fuir, plus la vision dans le détail va être atteinte.

La forme humide de la DMLA entraîne une perte de vision plus rapide, parfois en quelques jours ou quelques semaines et peut même mener à la perte totale de la vision centrale.

c) Clinique.

D'abord asymptomatique, la maladie, pouvant atteindre un seul ou les deux yeux, évolue jusqu'à donner lieu à des symptômes qui varient en fonction de la gravité de la maladie, mais qui n'occasionnent pas de douleur.

Le malade se plaint tout d'abord d'une baisse de la vision, d'un besoin d'accroître l'intensité lumineuse pour la lecture ou pour un travail de précision. Sa vision centrale est de plus en plus floue ou embrouillée, ce qui se remarque davantage à la lecture. Les autres symptômes sont constitués d'une adaptation lente après un éblouissement par une lumière vive ou lorsque la luminosité baisse soudainement, mais également d'une perception altérée des couleurs, qui paraissent plus ternes et difficiles à distinguer.

Dans le cas des formes humides, souvent bilatérales, la perte de la vision centrale est rapide et s'accompagne d'une distorsion des lignes droites, de près et de loin, ainsi que d'une difficulté à reconnaître les visages à distance. Au stade le plus avancé, il apparaît un point flou ou aveugle au centre du champ visuel (figure 31).



**Figure 31 :** Vision des patients atteints de DMLA humide.

d) Diagnostic.

Les circonstances de découverte d'une DMLA reposent sur l'apparition des signes cliniques liés à la maladie : baisse de l'acuité visuelle, présence de métamorphopsies (sensation de déformation des objets), etc. La confirmation du diagnostic est alors réalisée à l'aide de plusieurs examens cliniques.

Le premier d'entre eux consiste à mesurer l'acuité visuelle de chaque œil séparément, avec correction optique si nécessaire, de loin et de près. La présence d'un scotome central ou de métamorphopsies est également recherchée, en présentant au patient une grille d'Amsler,

constituée d'un quadrillage régulier. Pour finir, un examen du fond d'œil est pratiqué après dilatation pupillaire, afin d'observer la présence de drüsen, de zones d'atrophie de l'épithélium pigmentaire, d'hémorragies, d'exsudats secs et/ou de décollement de la rétine. Une angiographie du fond d'œil peut également y être associée, réalisée à l'aide de l'injection intraveineuse d'un colorant fluorescent.

e) Traitement.

Il n'existe malheureusement pas de traitement qui permette de réparer les dommages causés à la rétine, toutefois, il est possible d'empêcher que la maladie ne progresse.

Dans le cas des formes atrophiques, il n'existe actuellement aucun traitement et l'évolution se fait inexorablement vers la constitution d'un scotome central. Lorsque la baisse de l'acuité visuelle est sévère, une rééducation basse vision doit être proposée au patient.

Quant au traitement de la forme exsudative, il a pour but la destruction de la membrane néovasculaire choroïdienne et les possibilités thérapeutiques dépendent de la localisation des néovaisseaux. On peut ainsi avoir recours à :

- une photocoagulation au laser,
- une photothérapie dynamique, qui consiste en l'injection intraveineuse d'un photosensibilisant, la vertéporfine, puis en l'application d'un laser permettant la destruction de la néovascularisation,
- une thérapie transpupillaire
- un traitement chirurgical.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux recombinants, ciblés contre le facteur de croissance endothéliale, a également été proposée avec une certaine efficacité pour freiner l'évolution de la forme exsudative de la maladie. Il s'agit essentiellement du pegaptamib de sodium, du ranibizumab et du bevacizumab, mais leur coût et leur mode d'administration limitent leur utilisation.

**2-Œdème maculaire du diabétique.**

Le diabète sucré est une maladie grave qui entraîne des complications vasculaires, notamment au niveau de l'œil, comme la rétinopathie du diabétique. L'œdème maculaire est une complication de la rétinopathie et atteint environ 10% des patients. Il représente la principale cause de malvoyance des diabétiques.

a) Epidémiologie.

Sa prévalence est essentiellement liée à la durée du diabète : dans le diabète de type 1, elle est de 20% après 20 ans de maladie, alors qu'elle est de 28% dans le cas du diabète de type 2. L'œdème maculaire est plus fréquent chez les diabétiques traités par insuline (15%) que chez les diabétiques traités par hypoglycémifiants oraux (4%).

Les risques d'apparition de complications vasculaires chez le diabétique sont liés à la sévérité du diabète, l'équilibration des facteurs métaboliques, l'hypertension artérielle. Trois facteurs de risque principaux du développement d'un œdème maculaire ont été identifiés : taux élevé d'hémoglobine glyquée, longue durée du diabète et rétinopathie diabétique sévère.

b) Physiopathologie et clinique.

L'œdème maculaire se définit comme un épaissement de la région maculaire, lié à l'accumulation de liquide extracellulaire dans la rétine, secondaire à une diffusion anormale de constituants plasmatiques par rupture de la barrière hématorétinienne interne. Le VEGF est responsable de l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

Dans les cas plus avancés, les dommages aux vaisseaux sanguins empirent, avec des hémorragies importantes, des vaisseaux anormaux, et des zones de blocage dues aux fluides s'écoulant dans la rétine. L'occlusion des vaisseaux peut être telle que la rétine stimule la production de VEGF, responsable de l'apparition de nouveaux vaisseaux, fragiles et ayant tendance à se déchirer et à saigner.

L'œdème maculaire du diabétique atteint un seul ou les deux yeux, et le patient, comme dans le cas d'une DMLA, se plaint d'une baisse de la vision centrale, de métamorphopsies ou d'un scotome central. Le diagnostic est posé d'après les signes cliniques observés, mais également grâce à l'observation directe du fond d'œil ou par angiographie.

c) Traitement.

Les approches de traitement de l'œdème maculaire du diabétique sont similaires à celles du traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, puisque l'on retrouve des traitements chirurgicaux, ainsi que la photocoagulation au laser.

## **B) Molécules en phase d'essai.**

Comme précisé précédemment, l'œil, et plus particulièrement la rétine, est aisé à atteindre pour des thérapeutiques à base de siRNA. D'autre part, dans le cas de la DMLA ou de l'œdème maculaire, la cible moléculaire, constituée par le VEGF, est cliniquement validée : des études sur l'animal ont montré que le VEGF était nécessaire et suffisant pour la formation des néovaisseaux sanguins [204].

### **1-Cand 5 (bevasiranib).**

Le bevasiranib (Cand 5), développé par Opko Health (auparavant Acuity Pharmaceuticals), est la première thérapeutique à base de siRNA à être entrée en phase d'essai clinique, dès octobre 2004, pour le traitement de la DMLA [204]. C'est également la première molécule à avoir atteint la phase III des essais cliniques pour cette indication. Il est à noter que cette molécule est également en phase II, depuis début 2006, pour le traitement de l'œdème maculaire du diabétique, étant données les similitudes avec la DMLA au niveau de la physiopathologie.

Le bevasiranib est un siRNA nu non modifié ciblant les isoformes du VEGF-A, responsable de la stimulation de la synthèse des vaisseaux sanguins.

Les résultats de la phase I ont été annoncés en octobre 2005, au congrès de l'Académie Américaine d'Ophtalmologie. L'objectif de cette phase I était d'évaluer la sécurité du Cand 5. Quinze patients ont reçu la molécule à 5 doses croissantes (jusqu'à 3 mg par œil), en injection intraoculaire directe. Aucun effet secondaire relié au siRNA n'a été observé, toutefois, des effets secondaires attendus comme des hémorragies conjonctivales ont été observés (reliées à la voie d'administration). De plus, aucune délivrance systémique n'a été observée.

Cette étude a également mis en évidence les effets bénéfiques du Cand 5. Il s'avère que le médicament a permis de réduire la croissance des vaisseaux sanguins sur la rétine et que la vue a même été légèrement améliorée. Deux mois après l'injection, 25% des patients ont eu une vision plus claire, les autres ont eu leur vision stabilisée.

Les essais de phase II ont démontré que cette molécule, en fonction de la dose, est bénéfique notamment au niveau de la vision de près et de la taille des lésions. Les résultats obtenus indiquent également que cette molécule pourrait être utilisée en monothérapie ou en combinaison avec d'autres médicaments [204].

Les essais de phase III pour le traitement de la DMLA consistent en la comparaison du bevasiranib au ranibizumab (Lucentis), un fragment d'anticorps humanisé anti-VEGF-A, approuvé par la FDA. Cette étude, dénommée COBALT (Combining Bevasiranib And Lucentis Therapy) est menée pour déterminer l'efficacité du bevasiranib administré toutes les 8 à 12 semaines, versus l'administration de ranibizumab toutes les 4 semaines [44, 204].

### **2-Sirna 027.**

Le Sirna 027, également appelé AGN-211745, a été développé par la société Sirna Therapeutics, qui appartient aujourd'hui à Merck, dans le but de traiter principalement la DMLA, mais également la néovascularisation de la choroïde. Les essais cliniques avec cette molécule ont débuté seulement quelques temps après celui du Cand 5, en novembre 2004, et il s'agissait du premier essai clinique concernant un siRNA modifié chimiquement [139].

Le Sirna 027, qui cible le récepteur 1 du VEGF, est actuellement en essai clinique de phase II pour les deux indications pour lesquelles il a été mis au point [44].

Dans le cadre du traitement de la DMLA par le Sirna 027, les résultats de la phase I ont été annoncés en juin 2005 au congrès de la Société Américaine de Thérapie Génique.

Cette étude a été menée sur des doses uniques croissantes (de 100 à 800 µg), administrées par injection intraoculaire directe. Aucune toxicité significative n'a été observée et durant la brève période d'observation, l'acuité visuelle a été stabilisée voire même améliorée de façon dose-dépendante.

### **3-RTP801-i-14.**

Le RTP801i-14, également appelé PF-4523655, a été développé par l'entreprise Quark Pharmaceuticals [215], en collaboration avec Pfizer Inc avec comme indication principale le traitement de l'œdème maculaire du diabétique, et secondairement le traitement de la DMLA. Cette molécule est actuellement en essai clinique de phase II pour les deux indications.

La raison pour laquelle Pfizer a choisi l'œdème maculaire du diabétique comme indication principale plutôt que la DMLA peut être reliée au fait que le traitement de la DMLA à l'aide de thérapeutiques RNAi est déjà très étudié par Opko Health et Sirna Therapeutics/Merck, qui ont des molécules en essai de phase III et II.

Ce siRNA cible le gène RTP801, rapidement induit en réponse à une ischémie, une hypoxie et/ou un stress oxydatif. Ce gène RTP801 représente donc une cible unique permettant de

réguler les phénomènes pathogéniques reliés à une hypoxie, et ce, de manière indépendante des facteurs de croissance comme le VEGF. Il a été montré *in vivo* chez la souris que l'inhibition du gène RTP801 permet l'induction de facteurs anti-angiogéniques, ce qui a pour conséquence la réduction du volume de la néovascularisation de la choroïde, de la fuite des vaisseaux, et également de l'infiltration de la rétine par des cellules inflammatoires.

D'autre part, de récentes publications indiquent qu'une inhibition prolongée de la voie de signalisation du VEGF pourrait avoir des effets néfastes sur la rétine, d'où l'intérêt d'intervenir à un autre niveau du mécanisme pathogénique. Le PF-4523655 paraît ainsi plus sûr et efficace que les substances anti-VEGF [139], d'autant qu'il a montré posséder des propriétés anti-inflammatoires et anti-apoptotiques.

Les résultats d'une étude de phase I/II menée par Quark ont précédemment montré que la molécule est sûre et bien tolérée chez les patients atteints de DMLA.

L'essai clinique de phase II, débuté avec le PF-4523655 pour le traitement de l'œdème maculaire du diabétique, a pour but d'évaluer, sur 160 patients, la sécurité et l'efficacité de la molécule en comparaison de la photothérapie au laser. L'étude met en jeu l'injection intraoculaire d'une dose de médicament (parmi 3 évaluées) et l'effet thérapeutique sera déterminé sur l'acuité visuelle et un examen morphologique de la rétine, sur une période de suivi de 36 mois.

### **III. TRAITEMENT DES INFECTIONS VIRALES.**

#### **A) Virus respiratoire syncytial.**

Il existe plusieurs avantages à la délivrance directe de siRNA dans les poumons. L'administration aux poumons par inhalation est non invasive, et cible directement le tissu épithélial, ceci augmente les concentrations de médicament au niveau du tissu cible, tout en évitant un effet métabolique de premier passage, ce qui permet de diminuer les doses administrées et donc les effets secondaires systémiques potentiels. Les cellules épithéliales pulmonaires sont capables d'internaliser les siRNA nus et d'initier une extinction par ARN interférence. De plus, l'environnement local pulmonaire est relativement pauvre en endonucléases, en comparaison du sérum [53].

La première étude pulmonaire menée avec des siRNA a concerné le traitement des infections provoquées par le virus respiratoire syncytial (VRS). Ce virus est responsable de graves infections respiratoires néonatales, nécessitant souvent une hospitalisation, mais pouvant être également dangereux pour les personnes âgées ou immunodéprimées [287].

### **1-Pathologie à VRS.**

Le VRS est un Paramyxovirus, comprenant deux sérotypes A et B. Il s'agit d'un virus à ARN monocaténaire, de polarité négative, formé d'une nucléocapside à symétrie hélicoïdale et d'une enveloppe phospholipidique comportant des péplomères, des glycoprotéines lui permettant de se fixer sur les cellules respiratoires (protéine G), et de fusionner avec les membranes cellulaires (protéine F).

#### **a) Epidémiologie.**

Le VRS est un virus hautement contagieux, actif principalement durant la saison froide (octobre à mars) et qui provoque des infections de l'arbre respiratoire. C'est l'agent pathogène respiratoire le plus fréquent chez les nourrissons et les jeunes enfants ; chaque enfant est infecté précocement au moins une fois avant l'âge de 2 ans. Le VRS peut mener à une hospitalisation suite à une infection chez les enfants, les personnes âgées ou les personnes immunodéprimées. Chez l'adulte, l'infection à VRS est rare et bénigne ; elle se traduit essentiellement par une rhinite ou un syndrome pseudo-grippal.

Le VRS est responsable de 10% des laryngites virales, de 20% des rhinopharyngites, de 50% des bronchites et des pneumonies, mais surtout, il est responsable de 90% des bronchiolites du nourrisson.

#### **b) Physiopathologie.**

Le VRS atteint tout le système respiratoire, notamment les bronchioles et les alvéoles pulmonaires. Le virus pénètre par voie aérienne, en général par voie nasale. Il envahit alors l'épithélium bronchiolaire en s'y fixant grâce à ses protéines G puis en fusionnant sa membrane avec celle des cellules à l'aide de ses protéines F. Le virus se multiplie alors dans les cellules, ce qui entraîne une nécrose cellulaire. S'ensuivent une réaction inflammatoire, une infiltration par les lymphocytes, les macrophages et les polynucléaires, mais également une hyperproduction des cellules à mucus, avec formation de bouchons muqueux ; la lumière bronchique est alors plus étroite, menant à des troubles ventilatoires obstructifs.

c) Clinique.

Différents symptômes et complications sont associés à l'infection par le VRS ; ils apparaissent généralement après une période d'incubation de 2 à 6 jours.

Les symptômes d'une infection légère sont semblables à ceux d'un rhume. On observe une congestion, une toux, des maux de tête, un écoulement nasal ainsi que des maux de gorge.

Dans le cas d'une infection grave, le patient présente également une toux, mais accompagnée d'une forte fièvre, d'une baisse de la teneur du sang en oxygène, une respiration rapide et superficielle, ou sifflante, ou difficile.

A court terme, une infection par le VRS connaît une évolution favorable dans la majorité des cas. L'obstruction bronchique persiste durant 8 à 10 jours, la toux durant 15 jours, et après 3 à 4 semaines, la muqueuse retrouve son intégrité.

Dans certains cas, notamment chez les nourrissons, les personnes âgées ou immunodéprimées, l'infection au VRS peut entraîner une détresse respiratoire, justifiant une hospitalisation.

d) Diagnostic.

Le diagnostic d'une infection au VRS est réalisé soit de manière directe en recherchant la présence du virus dans des prélèvements de cellules ciliées au niveau nasal (par immunofluorescence), soit de manière indirecte en recherchant des anticorps contre le virus.

e) Traitement.

Disposer d'un traitement efficace contre les infections au VRS reste un véritable besoin médical pour les nourrissons, les personnes âgées ou immunodéprimées. Il n'existe aucun vaccin contre le VRS, et les médicaments disponibles (Ribavirine® ou Synagis®, un anticorps monoclonal) présentent une utilisation limitée, ainsi qu'une trop faible efficacité.

La seule réelle prise en charge des malades consiste en un traitement symptomatique.

**2-Molécule en essai : ALN-RSV01.**

L'ALN-RSV01 est un siRNA nu, non modifié, développé par Alnylam [10] dans le but d'inhiber l'ARNm utilisé pour produire la protéine de la nucléocapside, essentielle pour la réplication virale. L'administration se fait directement au niveau des poumons pour inhiber le

gène cible dans les cellules infectées, et ainsi neutraliser le virus et l'empêcher de se répandre. Ce siRNA est actuellement en essai clinique de phase II.

Dès décembre 2005, deux essais de phase I ont été menés sur 100 volontaires sains adultes avec l'ALN-RSV01 afin d'en évaluer la sécurité, la tolérance et les caractéristiques pharmacocinétiques après administration intranasale [57].

La molécule a été administrée à l'aide d'un spray nasal, à des doses uniques ou doses journalières multiples. Il s'est révélé sûr et bien toléré, avec un profil d'effets secondaires comparable à celui observé dans le cas d'un placebo. De plus, aucune anomalie n'a été observée au niveau de l'électrocardiogramme, ni aucun signe d'exposition systémique.

La molécule a également été testée en administration par inhalation avec un nébuliseur, à des doses uniques ou multiples (de 0,1 à 3 mg/kg et de 0,01 à 0,6 mg/kg), administrées une fois par jour pendant 3 jours. Aucun effet secondaire sérieux n'a été observé durant cette étude.

Le premier essai de phase II réalisé avec l'ALN-RSV01 dès juin 2007, a concerné des adultes sains, mais infectés par une lignée de VRS sauvage. Cette étude a été menée sur 90 personnes, pour déterminer la sécurité, la tolérance et l'activité antivirale de la molécule. Après administration intranasale durant 5 jours (2 jours avant l'inoculation du virus et 3 jours après), le traitement a présenté une activité antivirale statistiquement significative.

Le second essai de phase II a été débuté en avril 2008 sur des patients naturellement infectés par le VRS. L'objectif de cette étude est d'évaluer la sécurité et la tolérance de la molécule après administration intranasale à l'aide d'un nébuliseur (système d'administration pressenti pour la commercialisation) mais également son efficacité antivirale.

## **B) Hépatite C.**

Le virus de l'hépatite C est une cible thérapeutique validée et étant donné qu'il s'agit d'un virus à ARN, son génome est une cible idéale pour les siRNA [269]. De plus, d'après les études *in vivo* sur animal, le foie est connu pour être l'organe le plus accessible aux acides nucléiques [269].

### **1-Description.**

L'hépatite C est une maladie infectieuse provoquée [287] par le virus de l'hépatite C (VHC), qui s'attaque au foie. L'infection se caractérise par une inflammation du foie, souvent

asymptomatique, mais qui peut évoluer vers une hépatite chronique pouvant mener à une cirrhose ou un cancer du foie (10% des cas).

Le VHC est un Flavivirus, qui existe sous la forme de 6 génotypes différents. Il s'agit d'un virus à ARN monocaténaire de polarité positive, constitué d'une capsidie icosaédrique et d'une enveloppe lipidique.

a) Epidémiologie.

Le VHC est responsable de 20% des hépatites aiguës, de 70% des hépatites chroniques, ainsi que de 60% des hépatocarcinomes. Sa transmission se fait par voie sanguine, très rarement par voie sexuelle, ou encore, par voie périnatale. On estime que 150 à 200 millions de personnes sont atteintes dans le monde, essentiellement par la transfusion de sang qui n'a pas été soumis à un dépistage et la réutilisation d'aiguilles et de seringues non stériles.

L'évolution de l'infection dépend de facteurs aggravants tels que l'âge, le sexe (chez les hommes, l'évolution de la maladie est plus rapide que chez les femmes), la consommation d'alcool, la stéatose hépatique, l'excès de poids, la co-infection par le VIH, et le type de virus parmi les 6 génotypes.

b) Clinique.

Après la contamination et une phase d'incubation de 5 à 12 semaines survient la phase aiguë de l'infection, allant du début de l'infection jusqu'aux six premiers mois.

Dans 60 à 70% des cas, cette phase est asymptomatique, mais chez une minorité de patients, on retrouve des symptômes non spécifiques, tels qu'une perte d'appétit, un état de fatigue, des douleurs abdominales, un état pseudo-grippal, un prurit ou un ictère. En règle générale, la durée de ces symptômes est inférieure à 3 mois. Les formes gravissimes d'hépatite, dites fulminantes, sont rarissimes.

Au cours de cette phase, environ 20 à 30% des personnes infectées éliminent spontanément le virus, comme en témoigne la normalisation des tests hépatiques, ainsi que la disparition du plasma de l'ARN du virus. *A contrario*, environ 70 à 80% des personnes infectées évoluent vers une hépatite C chronique.

L'hépatite C chronique est définie par une infection persistant plus de six mois. Cliniquement, cette maladie est souvent asymptomatique et est généralement de découverte fortuite.

Les symptômes évocateurs d'une maladie du foie sont généralement absents jusqu'à la cicatrisation des lésions hépatiques (fibrose). Toutefois, l'hépatite C est une maladie systémique et les patients peuvent présenter une grande variété de manifestations cliniques allant de l'absence totale de symptômes à une maladie avérée, jusqu'au développement d'une maladie hépatique avancée. Les signes et les symptômes associés à une hépatite C chronique sont une fatigue, une perte de poids importante, un état pseudo-grippal, des douleurs musculaires, des douleurs articulaires, une fièvre peu élevée et intermittente, des démangeaisons, des troubles du sommeil, des douleurs abdominales, des troubles de l'appétit, des nausées, de la diarrhée, des troubles dyspeptiques, des troubles cognitifs, des troubles dépressifs et des maux de tête.

L'hépatite C chronique, davantage que d'autres formes d'hépatite, est souvent diagnostiquée en raison de manifestations extra hépatiques associées à la présence du virus. On peut rencontrer une thyroïdite avec hyperthyroïdie, une hypothyroïdie, une porphyrie cutanée tardive, une cryoglobulinémie et une glomérulonéphrite.

L'évolution sans traitement se fait :

- dans un tiers des cas vers une hépatite chronique modérément active ou très active qui peut aboutir à une cirrhose en 10 à 20 ans. Parmi ces cas, certains développeront un carcinome hépatocellulaire.
- dans un autre tiers vers une hépatite chronique peu active qui peut soit ne pas évoluer, soit aboutir à une cirrhose après 30 ans.
- le reste des patients semble avoir une fibrose qui progresse si lentement qu'ils ont peu de chance de développer une cirrhose dans le cours normal de leur vie.

Lorsque l'hépatite C chronique a atteint le stade de cirrhose, les signes et les symptômes qui peuvent apparaître sont généralement provoqués par une altération des fonctions hépatiques ou une augmentation de la pression sanguine intra-hépatique (hypertension portale). Ainsi, une possible cirrhose du foie se traduit par une ascite, des ecchymoses et une tendance au saignement, des douleurs osseuses, des varices oesophagiennes, l'émission de selles graisseuses, un ictère et un syndrome de déficience cognitive (encéphalopathie hépatique).

### c) Diagnostic.

Le diagnostic de l'hépatite C est rarement fait au cours de la phase aiguë de la maladie en raison de son caractère asymptomatique. Les signes sont par ailleurs souvent non spécifiques. L'infection par le VHC peut être suspectée sur la base des antécédents médicaux, de certains

symptômes, ou des anomalies des enzymes hépatiques ou de la fonction hépatique au cours d'examens sanguins de routine.

Le diagnostic d'une infection par le virus de l'hépatite C peut être réalisé de manière non spécifique, par analyse des taux de transaminases hépatiques, mais également de façon spécifique, par recherche des anticorps développés contre le virus, ou par détection du génome viral. Le VHC est habituellement détectable dans le sang 1 à 3 semaines après le début de l'infection, et les anticorps contre le virus apparaissent généralement en moins de 3 à 12 semaines.

#### d) Traitement.

Il n'existe aucun vaccin disponible contre l'hépatite C. D'autre part, bien que la prise en charge médicale précoce soit utile, les personnes atteintes d'une infection par le VHC ne présentent souvent que des symptômes bénins et ne sont pas demandeuses d'un traitement.

Les symptômes de l'infection peuvent souvent être contrôlés médicalement et, chez une certaine proportion des patients, le virus peut être rendu indétectable par l'administration de médicaments anti-viraux au long cours.

Le traitement de référence, d'une durée de 24 ou 48 semaines, est une combinaison d'interféron alpha pégylé et de ribavirine, un antiviral. Pour les patients non répondeurs, une trithérapie peut être mise en place par ajout d'un autre antiviral, l'amantadine.

Le traitement peut être physiquement éprouvant et les effets secondaires sont nombreux, variant suivant les personnes, mais disparaissant à la fin du traitement. Dans la plupart des cas, le patient doit cesser toute activité à cause de ces effets. L'injection d'interféron provoque un syndrome pseudo-grippal (forte fièvre, courbatures et mal de tête). Les autres symptômes sont la fatigue, les insomnies, la perte des cheveux, la sécheresse de la peau. Un trouble du caractère et un dérèglement de la glande thyroïde peuvent aussi survenir. Dans le cas de la ribavirine, l'effet secondaire principal est l'anémie, provoquant un essoufflement, une tachycardie et une fatigue. L'association des deux médicaments intensifie la fréquence des différents effets indésirables.

#### **2-Molécules en essai.**

La première thérapeutique étudiée pour traiter l'infection par le VHC est le Sirna 034, un siRNA chimiquement modifié, développé par la société Sirna therapeutics et entré en phase I

fin 2006. Il s'agit de 2 siRNA, ciblant différentes séquences très conservées du génome viral, et délivrés par l'intermédiaire de nanoparticules.

Il a été précédemment démontré, sur des souris et des primates non humains, que le système de formulation utilisé permettait la délivrance aux hépatocytes. De plus, cette thérapeutique permet de diminuer de façon importante la charge virale dans l'organisme, et ce pendant 4 semaines.

Une autre thérapeutique basée sur l'ARN interférence est en cours d'essai clinique pour le traitement de l'hépatite C ; il s'agit du BLT-HCV, entré en phase I depuis fin 2006 et développé par Benitec [26].

C'est une combinaison de 3 séquences de siRNA ciblant le génome du VHC, et où chaque composant pris individuellement s'est révélé efficace pour inhiber le virus sur culture cellulaire mais également sur des rongeurs.

Benitec souligne l'importance du ciblage multiple afin d'éviter le développement de résistances, qui s'avère être un véritable problème avec les traitements existants et les molécules en cours de développement. De même, la société n'exclut pas l'utilité d'associer son traitement aux autres médicaments disponibles (interféron et/ou ribavirine) afin d'éliminer complètement l'infection par le VHC.

## **C) Hépatite B.**

### **1-Description.**

L'hépatite B est une maladie infectieuse provoquée par le virus de l'hépatite B (VHB), entraînant une inflammation du foie. La gravité potentielle de l'hépatite B est constituée par le risque d'évolution vers une hépatite chronique qui peut se compliquer d'une cirrhose du foie et d'un cancer du foie [287].

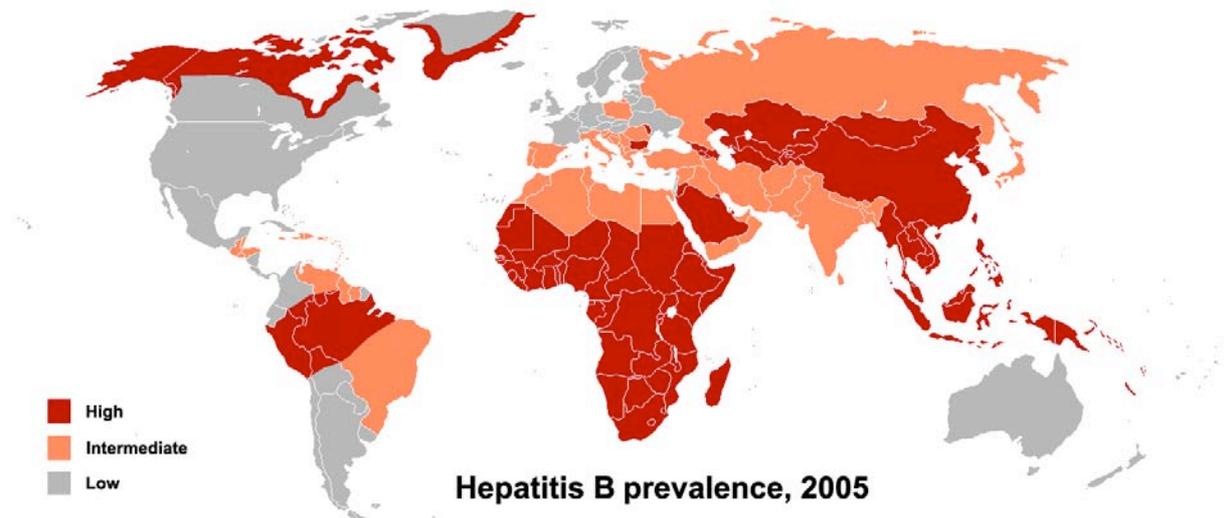
Le VHB est un virus à ADN appartenant à la famille des *Hepadnaviridae*, constitué d'une nucléocapside icosaédrique et d'une enveloppe lipidique. Le virus possède également une ADN polymérase qui a une activité de transcriptase inverse utilisée dans le cadre de son processus de réplication. Le VHB existe sous la forme de 4 sérotypes et de 8 géotypes.

#### **a) Epidémiologie.**

La transmission de la maladie résulte d'une exposition au sang infectieux ou à des liquides organiques contenant du sang. Parmi les voies possibles de transmission, on retrouve ainsi la

transfusion sanguine, la transmission iatrogène par utilisation de matériel non stérilisé, la transmission sexuelle ou la transmission de la mère à l'enfant.

L'hépatite B est l'une des maladies humaines les plus fréquentes (figure 32). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 2 milliards le nombre de personnes qui sont ou ont été infectées par le VHB, dont 370 à 400 millions sont des porteurs chroniques.



**Figure 32 :** Répartition du risque géographique d'infection par le VHB.

L'hépatite B entraîne le décès d'un à 2 millions d'individus par an. En effet, la contagiosité élevée du virus est liée à sa présence dans la majorité des liquides biologiques.

#### b) Clinique.

Le VHB interfère d'abord avec les fonctions du foie en se répliquant dans les hépatocytes. Au cours de l'infection, la réponse immunitaire hépatocellulaire est responsable à la fois des lésions hépatiques et de l'élimination du virus.

L'infection par le VHB peut soit être aiguë, soit chronique et évoluant alors à long terme. Les personnes dont le système immunitaire peut contrôler l'infection guérissent spontanément dans un délai d'une semaine à plusieurs mois.

L'hépatite aiguë est peu fréquente, et survient après une période d'incubation de 2 à 3 mois. Elle se caractérise par un syndrome pré-ictérique (coloration jaune de la peau et des muqueuses) et se présente sous différentes formes.

Dans environ 70% des cas, la maladie est asymptomatique ou anictérique.

On observe une forme symptomatique de la maladie dans 30% des cas. La maladie commence par une altération de l'état général, une légère fièvre, des douleurs mal systématisées, le tout évoquant un état grippal, ainsi que des troubles digestifs, une perte d'appétit, des nausées, des vomissements, l'ictère apparaît plus tard. La maladie dure quelques semaines, mais la plupart des personnes touchées présentent une amélioration progressive.

Dans environ 1 à 2% des cas, on observe une forme fulminante d'hépatite où les patients présentent un faible taux de prothrombine et des signes neurologiques d'insuffisance hépatique. Cette forme est létale dans 90% des cas.

L'infection chronique est définie par la persistance du virus pendant plus de 6 mois après la contamination, et elle est le plus souvent asymptomatique. Le plus courant des symptômes est une asthénie, et l'hépatite chronique est caractérisée histologiquement par des lésions hépatiques associant nécrose hépatocytaire, infiltrat inflammatoire et fibrose. Dans le cas d'une hépatite chronique active, on peut observer certains symptômes tels qu'une petite fièvre, une hépatomégalie et/ou splénomégalie, des poussées ictériques associées à un syndrome pseudo-grippal (céphalées, douleurs articulaires et musculaires, nausées, diarrhée, urines foncées). On peut également observer des manifestations extra-hépatiques dues au dépôt de complexes immuns.

La cirrhose représente environ 20% des évolutions naturelles des hépatites chroniques, et on observe chez les patients des signes cliniques d'insuffisance hépatocellulaire et d'hypertension portale.

Le VHB est un puissant carcinogène et le risque de développer un hépatocarcinome est multiplié par 100 chez les porteurs du virus.

#### c) Diagnostic.

Chez un porteur chronique de l'hépatite B, l'examen clinique est souvent normal et le diagnostic repose alors principalement sur la sérologie, afin de détecter l'antigène viral ou les anticorps produits par le malade.

#### d) Traitement.

L'infection aiguë par le VHB ne nécessite habituellement pas de traitement puisque la plupart des adultes guérissent spontanément.

Les personnes chroniquement infectées nécessitent un traitement. Bien qu'aucun des médicaments disponibles ne soit capable d'éliminer le virus, certaines molécules peuvent stopper la réplication du virus, et prévenir les atteintes du foie comme la cirrhose et le cancer du foie. Les traitements consistent en l'utilisation d'antiviraux qui sont des analogues nucléosidiques et nucléotidiques (lamivudine, adéfovir, entecavir, ...) et de modulateurs du système immunitaire tels que l'interféron alpha. Toutefois, certaines personnes sont beaucoup plus susceptibles de répondre que d'autres, probablement en raison du génotype du virus impliqué ou de l'hérédité du patient.

D'une manière générale, les traitements à base d'analogues nucléosidiques peuvent provoquer des nausées, des maux de tête, des vomissements, des diarrhées, des étourdissements, ... Lors d'un traitement à l'interféron, un syndrome pseudo-grippal, d'intensité variable, peut survenir chez certains sujets.

La transplantation hépatique est indiquée en cas de cirrhose sévère, d'hémorragie digestive ou d'encéphalopathie.

Il existe un vaccin permettant d'éviter l'infection par le VHB. Il ne permet pas de guérir les porteurs chroniques, mais il est efficace de 90 à 95% pour prévenir l'apparition de cet état.

### **2-Molécule en essai : NucB-1000.**

NucB-1000 est une thérapeutique basée sur l'ARN interférence, développée par Nucleonics Inc [197] afin de traiter les infections au VHB par administration systémique, et pour laquelle un essai clinique de phase I a débuté en janvier 2008. La société était supposée initier les essais cliniques chez l'homme début 2005, mais a dû les retarder puisque l'optimisation de la formulation du traitement pour l'administration IV s'est révélée plus difficile que prévu.

Le traitement développé par Nucleonics consiste en une construction d'ADN plasmidique conçue pour exprimer, sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase III, 4 shRNA ciblant différentes séquences du génome du VHB. Cette construction est formulée avec un système de délivrance basé sur l'utilisation d'un lipide cationique.

Pour cet essai clinique de phase I, 15 patients atteints d'une hépatite B douce à modérée, et sans signe de cirrhose, ont été enrôlés et répartis en 5 groupes sur lesquels des doses différentes de NucB-1000 sont utilisées. L'objectif premier de l'essai est d'évaluer la sécurité du traitement, et dans un second temps, de mesurer les indicateurs biologiques de l'efficacité antivirale (par exemple la charge virale).

## IV. TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIVERSES.

### A) Lymphome associé au VIH.

L'émergence de résistances du virus VIH-1 aux traitements existants et les effets secondaires engendrés par les thérapeutiques utilisées impliquent la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement du SIDA [26].

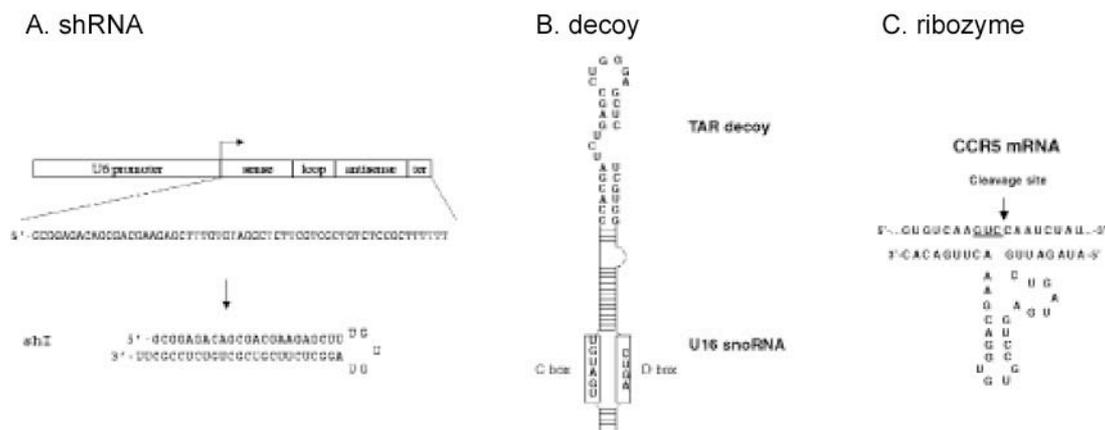
Environ 40 millions de personnes dans le monde sont infectées par le VIH, et environ 3 millions de personnes en meurent chaque année. Le VIH est une infection transmissible par voies sanguine et sexuelle, s'attaquant aux lymphocytes T, qui jouent un rôle central au sein du système immunitaire en combattant les autres formes d'infection. Le nombre de lymphocytes T dans l'organisme diminue au fur et à mesure que le virus se répand, et le système immunitaire cesse de fonctionner, menant à un état dans lequel les patients ne peuvent plus se battre eux-mêmes contre les infections. La plupart des patients ayant atteint le stade du SIDA meurent de pneumonies ou de cancers tels que le lymphome.

Benitec, une société australienne spécialisée dans les thérapeutiques basées sur l'ARN interférence, a initié, en collaboration avec le centre de recherche City of Hope basé en Californie, un essai clinique de phase I pour prévenir l'immunodéficience résultant de l'infection par le VIH [26]. Cet essai combine thérapie génique et ARN interférence, et met en jeu la transfection *ex vivo* des cellules génitrices hématopoïétiques CD34+ à l'aide d'un vecteur lentiviral. Ce type de vecteur a été choisi puisque les lentivirus sont capables de transférer les cellules quiescentes, incluant les lymphocytes T primaires et les cellules souches hématopoïétiques.

Le principe du traitement est de cibler les gènes du VIH lui permettant de pénétrer dans les cellules immunitaires et de se répliquer. La moelle osseuse contient des cellules souches capables de donner tous les types de cellules sanguines, incluant les leucocytes, qui forment une partie du système immunitaire. En donnant aux patients des cellules souches génétiquement modifiées portant des séquences anti-VIH, l'organisme des patients est capable de produire de nouveaux leucocytes qui sont résistants à l'attaque par le VIH, permettant ainsi aux malades de se défendre contre tout autre type d'infection.

Les cellules souches du patient sont récoltées à partir du sang périphérique et traitées *ex vivo*. Le vecteur lentiviral utilisé, appelé rHIV7-sh1-TAR-CCR5RZ, code pour 3 formes d'ARN

anti-VIH agissant à différents niveaux du cycle de réplication du virus [152] et exprimés sous le contrôle de promoteurs Pol III. On retrouve un shRNA ciblant un exon du tat/rev du VIH-1, associé à un decoy et un ribozyme dirigés contre d'autres cibles du VIH (figure 33). Quand ces cellules sont réadministrées aux patients, elles sont capables de produire des cellules immunitaires matures qui vont circuler dans l'organisme et le protéger contre le VIH.



**Figure 33 :** Eléments ARN utilisés pour le traitement du VIH. (d'après Li M.J., 2005)

Ce traitement influence toute la progéniture des cellules hématopoïétiques CD34+, incluant les lymphocytes T. Les paramètres pré-cliniques de sécurité et d'efficacité se sont révélés encourageants, et les cellules pluripotentes se sont avérées capable de se différencier normalement après la transfection par le lentivirus [152]. La production des cellules immunitaires modifiées persiste plus de 10 mois après le traitement, notamment chez les patients atteints de lymphome.

## B) Insuffisance rénale.

En novembre 2007, la société Quark a annoncé une autre innovation en développement dans le domaine de l'ARN interférence avec l'administration systémique d'une thérapeutique pour le traitement des atteintes rénales aiguës, notamment l'insuffisance rénale aiguë [194].

Dans l'essai clinique de phase I en cours, AKI-5 est administré en IV en tant que dose unique à des patients subissant une chirurgie cardiaque importante afin de prévenir une insuffisance rénale aiguë [44]. En effet, l'insuffisance rénale aiguë est une maladie grave qui se développe rapidement (en quelques heures ou quelques jours) de façon post-chirurgicale, et dont la mortalité s'élève à 65%. De plus, il n'existe aucun traitement efficace pour cette indication.

Quark a développé AKIi-5, également appelé QPI-1002 ou I5NP, qui est un siRNA chimiquement modifié, ciblant le gène suppresseur de tumeur p53 [215].

Le gène p53 joue un rôle important dans l'insuffisance rénale aiguë par induction de l'apoptose des cellules tubulaires, en réponse à un dommage de l'ADN, d'une hypoxie, d'un stress oxydatif ou d'autres facteurs, et le but du traitement est d'inhiber temporairement p53 afin de retarder l'apoptose et de cette façon, permettre aux mécanismes de réparation naturels de restaurer l'intégrité cellulaire.

Les études pré-cliniques ont été menées chez le rat et des primates non humains. Les rats traités avec AKIi-5 en une injection unique en bolus ont été significativement protégés d'une atteinte rénale aiguë induite par ischémie/reperfusion. Les études de pharmacocinétique, de distribution et de toxicité chez le rat et le singe ont démontré que AKIi-5 a un profil de sécurité favorable et un temps de séjour court dans le rein.

### **C) Pachyonichie congénitale.**

Transderm Inc a également développé des thérapeutiques siRNA, aujourd'hui transposées en clinique. Il s'agit du TD-101, conçu pour inhiber l'expression d'un gène cible au niveau de la peau, afin de traiter la pachyonichie congénitale [267].

Cette maladie est un désordre épithélial autosomique dû à une mutation sur n'importe lequel des gènes parmi la douzaine de ceux codant pour la kératine. C'est une maladie rare, touchant environ 550 patients dans le monde, et pour laquelle on ne dispose d'aucun traitement. La pachyonichie congénitale est caractérisée par une dystrophie hypertrophique des ongles et une atteinte des paumes avec apparition de cloques.

Les siRNA ciblant le gène mutant de kératine ont permis d'inverser le phénotype de la maladie *in vitro* et *in vivo*.

Dans un essai de phase I débuté en janvier 2008, les siRNA, non modifiés, ont été injectés de façon intradermique sur le dessous du pied du seul adulte aux Etats-Unis connu pour présenter la mutation particulière ciblée par le traitement. Le rythme d'administration de la molécule est de 2 fois par semaine sur 14 semaines. Bien que l'objectif principal de l'essai soit d'évaluer la sécurité du TD-101, il a été déterminé dans quelle mesure la molécule est capable d'inhiber le gène mutant ciblé.

Une méthode d'administration par voie topique est également en cours de développement au sein de la société pour TD-101.

*Conclusion générale*

L'ARN interférence est un processus cellulaire naturel découvert récemment par Andrew Fire et Craig Mello. Ce mécanisme, retrouvé dans de nombreux organismes allant des plantes jusqu'aux mammifères, serait ainsi un ancien système de défense et de maintien de l'intégrité du génome afin de lutter contre les infections virales ou les transposons.

Lorsqu'un ARN double brin se retrouve dans le cytoplasme d'une cellule eucaryote, il est pris en charge par une ribonucléoprotéine appelée Dicer qui le clive en plus petits ARN double brin. Ces derniers, les ARN interférents, sont incorporés dans un second complexe enzymatique qui est guidé par le brin antisens jusqu'à l'ARN messager de séquence complémentaire. Selon la nature de l'acide nucléique précurseur de cette cascade réactionnelle, on observe deux effets au niveau de l'ARNm : les siRNA, provenant de longs ARN double brin, induisent le clivage de l'ARNm alors que les miRNA, issus d'ARN en épingles à cheveux, provoquent soit une inhibition de la traduction, soit un clivage de l'ARNm en fonction de leur complémentarité de séquence. Le phénomène d'ARN interférence est très complexe et semble ne pas se limiter à ces effets au niveau post-transcriptionnel ; il intervient aussi au niveau transcriptionnel par formation d'hétérochromatine ou méthylation de l'ADN.

Compte tenu du caractère naturel de ce mécanisme, l'extinction obtenue est très robuste et spécifique, ce qui fait de l'ARN interférence un système révolutionnaire pour étudier la fonction des gènes, valider de potentielles cibles thérapeutiques et même développer de nouvelles thérapeutiques, par exemple dans les domaines de l'oncologie ou de la virologie.

De plus, il est assez facile de mettre en oeuvre une telle extinction, que ce soit par l'intermédiaire de longs ARN double brin, de systèmes d'expression d'ARN interférents, ou directement d'ARN interférents, cette dernière méthode présentant le moins d'inconvénients.

La technique d'ARN interférence ouvre donc des perspectives sans précédent dans le domaine de l'inhibition spécifique de l'expression des gènes, exploitable pour développer de nouvelles thérapeutiques pour l'Homme.

Malgré tout, il reste un obstacle majeur à l'utilisation répandue de l'ARNi : disposer d'une technique efficace de délivrance des siRNA. En effet, pour des applications thérapeutiques, on rencontre des problèmes de stabilité, de biodistribution, de ciblage, de pénétration cellulaire des siRNA ou d'induction d'éventuels effets secondaires.

Tout cela implique d'avoir recours à des systèmes adaptés, et les efforts de recherche des scientifiques ont déjà permis de développer des thérapeutiques basées sur l'ARN interférence qui sont actuellement en cours d'évaluation clinique sur l'Homme. Pour les plus avancées d'entre-elles, concernant le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, les essais cliniques en sont déjà à la phase III.

Aujourd'hui, de nombreuses autres thérapeutiques basées sur l'ARN interférence sont à l'étude en phase pré-clinique [22, 194]. Ces études concernent des pathologies très variées, telles que les maladies métaboliques, les cancers ou les infections virales, pour lesquelles différents types de vecteurs de transfection sont utilisés.

Cependant, il reste encore de nombreuses interrogations concernant l'utilisation de l'ARN interférence pour le traitement des maladies humaines. En effet, les maladies chroniques comme l'hépatite C ou le VIH nécessitent des traitements au long cours et il n'y a pas encore assez de recul concernant les effets potentiels d'une utilisation répétée ou prolongée de siRNA sur le métabolisme cellulaire normal. Il est tout à fait envisageable que de tels effets toxiques ne soient pas révélés sur seulement quelques mois voire même quelques années [127].

La technologie d'ARN interférence, bien que semblant très prometteuse, nécessite donc encore de nombreuses études afin de s'assurer de son efficacité dans des applications définies, mais aussi de sa totale innocuité sur l'organisme.

## *Liste des figures*

## CHAPITRE 1 : DECOUVERTE DE L'ARN INTERFERENCE

Figure 1 : Etapes de la synthèse d'une protéine dans les cellules eucaryotes. ....	11
Figure 2 : Représentation de la formation d'une triple hélice entre l'ADN et un oligonucléotide. ....	12
Figure 3 : Représentation de l'invasion de brin de l'ADN par un oligonucléotide. ....	13
Figure 4 : Stratégies d'extinction post-transcriptionnelle. ....	13
Figure 5 : Schéma d'intégration aléatoire d'un transposon dans le génome. ....	17

## CHAPITRE 2 : MECANISME DE L'ARN INTERFERENCE

Figure 6 : Mécanisme général de l'extinction post-transcriptionnelle lors de l'ARN interférence. ....	21
Figure 7 : Mécanisme d'action des siRNA. ....	22
Figure 8 : Formation endogène des miRNA. ....	24
Figure 9 : Mécanisme d'action des miRNA. ....	25
Figure 10 : Synthèse secondaire d'ARN double brin à partir du siRNA apparié à l'ARNm, lors de l'ARNi transitive. ....	26
Figure 11 : Transcription symétrique de promoteurs opposés. ....	28

## CHAPITRE 3 : MISE EN OEUVRE DE L'ARN INTERFERENCE

Figure 12 : Méthodes d'expression endogène d'ARN interférents. ....	39
Figure 13 : Méthodes d'expression exogène d'ARN interférents. ....	41
Figure 14 : Réponse cellulaire induite par l'interféron. ....	41
Figure 15 : Conditions de conception d'un siRNA efficace. ....	43
Figure 16 : Représentation schématique de la biodistribution générale, et des obstacles rencontrés lors d'une administration intraveineuse. ....	46

## CHAPITRE 4 : METHODES DE TRANSFECTION

Figure 17 : Modifications chimiques des siRNA. ....	54
Figure 18 : Principe de l'électroporation. ....	56
Figure 19 : Principe de la microinjection. ....	59
Figure 20 : Stratégies de transfection des siRNA par conjugaison. ....	64
Figure 21 : Mécanisme de pénétration cellulaire des complexes cationiques. ....	68
Figure 22 : Description schématique des composants structuraux de transfection. ....	69
Figure 23 : Formule du PEG. ....	69
Figure 24 : Formulation liposomale pour la transfection des siRNA. ....	71
Figure 25 : Mécanisme de l'éponge à protons. ....	73
Figure 26 : Structure des dendrimères. ....	75

Figure 27 : Représentation de la liaison non covalente de siRNA avec des protéines de fusion anticorps-protamine. ....76

Figure 28 : Principales méthodes de transfection applicables à la délivrance des siRNA *in vivo*. ....78

## CHAPITRE 6 : ESSAIS CLINIQUES

Figure 29 : Principaux essais cliniques en cours dans le domaine de l'ARN interférence. ....83

Figure 30 : Physiopathologie de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. ....86

Figure 31 : Vision des patients atteints de DMLA humide. ....87

Figure 32 : Répartition du risque géographique d'infection par le VHB. ....100

Figure 33 : Eléments ARN utilisés pour le traitement du VIH. ....104

## *Références bibliographiques*

## A

1. Agrawal S., Zhao Q., Jiang Z., Oliver C., Giles H., Heath J., Serota D.  
Toxicologic effects of an oligodeoxynucleotide phosphorothioate an dits analogs following intravenous administration in rats  
*Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* (1997), **7**, 575-584
2. Agrawal N., Dasaradhi P.V.N., Mohmmmed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K.  
RNA Interference : Biology, Mechanism, and Applications  
*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2003), **67** (4), 657-685
3. Aigner A.  
Gene silencing through RNA interference (RNAi) *in vivo* : Strategies based on the direct application of siRNAs  
*J. Biotechnol.* (2006), **124** (1), 12-25
4. Akaneya Y., Jiang B., Tsumoto T.  
RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region  
*J. Neurophysiol.* (2005), **93**, 594-602
5. Akhtar S., Agrawal S.  
*In vivo* studies with antisense oligonucleotides  
*Trends Pharmacol. Sci.* (1997), **18**, 12-18
6. Akhtar S., Hughes M.D., Khan A., Bibby A., Hussain M., Nawaz Q., Double J., Sayyed P.  
The delivery of antisense therapeutics  
*Adv. Drug Deliv. Rev.* (2000), **44**, 3-21
7. Akhtar S., Benter I.  
Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi : Potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity  
*Adv. Drug Deliv. Rev.* (2007), **59**, 164-182
8. Akhtar S., Benter I.F.  
Nonviral delivery of synthetic siRNAs *in vivo*  
*J. Clin. Invest.* (2007), **117**, 3623-3632
9. Allerson C.R., Sioufi N., Jarres R., Prakash T.P., Naik N., Berdeja A., Wanders L., Griffey R.H., Swayze E.E., Bhat B.  
Fully 2'-modified oligonucleotide duplexes with improved *in vitro* potency and stability compared to unmodified small interfering RNA  
*J. Med. Chem.* (2005), **48**, 901-904
10. Alnylam Pharmaceuticals  
[www.alnylam.com](http://www.alnylam.com)
11. Amarzguioui M., Holen T., Babaie E., Prydz H.  
Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA  
*Nucleic Acids Res.* (2003), **31** (2), 589-595
12. Anson D.S.  
The use of retroviral vectors for gene therapy – what are the risks ? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery.  
*Genet Vaccines Ther* (2004), **2**, 1-9
13. Aoki K., Furuhashi S., Hatanaka K., Maeda L., Remy J.S., Behr J.P., Terada M., Yoshida T.  
Polyethylenimine-mediated gene transfer into pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity  
*Gene Ther.* (2001), **8**, 508-514
14. Archacki S, Wang Q.  
Expression profiling of cardiovascular disease.  
*Hum Genomics*, (2004), **1** (5), 355-370

15. Arnold A.S., Tang Y.L., Qian K., Shen L., Valencia V., Phillips M.I., Zhang Y.C.  
Specific beta 1-adrenergic receptor silencing with small interfering RNA lowers high blood pressure and improves cardiac function in myocardial ischemia  
*J. Hypertens.* (2007), **25**, 197-205

## B

16. Babcock A.M., Standing D., Bullshields K., Schwartz E., Paden C.M., Poulsen D.J.  
*In vivo* inhibition of hippocampal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by RNA interference  
*Mol. Ther.* (2005), **11**, 899-905
17. Bagga S., Bracht J., Hunter S., Massirer K., Holtz J., Eachus R., Pasquinelli A.E.  
Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation  
*Cell* (1979), **122**, 553-563
18. Bahi A., Boyer F., Kolira M., Dreyer J.L.  
*In vivo* gene silencing of CD81 by lentiviral expression of small interference RNAs suppresses cocaine-induced behaviour  
*J. Neurochem.* (2005), **92**, 1243-1255
19. Baigude H., McCarroll J., Yang C.S., Swain P.M., Rana T.M.  
Design and Creation of New Nanomaterials for Therapeutic RNAi  
*ACS Chem. Biol.* (2007), **2** (4), 237-241
20. Bartlett D.W., Davis M.E.  
Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging.  
*Nucleic Acids Res.* (2006), **34**, 322-333
21. Bass B.L.  
Double-stranded RNA as a template for gene silencing  
*Cell* (2000), **101**, 235-238
22. Behlke M.A.  
Progress towards *in vivo* Use of siRNAs  
*Mol. Ther.* (2006), **13** (4), 644-670
23. Behr J.P.  
Synthetic Gene-Transfer Vectors.  
*Acc. Chem. Res.* (1993), **26**, 274-278
24. Behr J.P.  
Gene Transfer with Synthetic Cationic Amphiphiles : Prospects for Gene Therapy.  
*Bioconjug. Chem.* (1994), **5**, 382-389
25. Behr J.P.  
The Proton Sponge : a Trick to enter Cells the Viruses did not exploit  
*Chimia* (1997), **51**, 27-30
26. Benitec Ltd  
[www.benitec.com](http://www.benitec.com)
27. Bernstein E., Caudy A.C., Hammond S.M., Hannon G.J.  
Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference  
*Nature* (2001), **409**, 363-366
28. Bertrand J.R., Pottier M., Vekris A., Opolon P., Maksimenko A., Malvy C.  
Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2002), **296**, 1000-1004
29. Bitko V., Musiyenko A., Shulyayeva O., Barik S.  
Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA  
*Nat. Med.* (2005), **11**, 50-55

30. Blaszczyk J., Tropea J.E., Bubunenko M., Routzahn K.M., Waugh D.S., Court D.L., Ji X.  
Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage  
*Structure* (2001), **9**, 1225-1236
31. Bohula E.A., Salisbury A.J., Sohail M., Playford M.P., Riedemann J., Southern E.M., Macaulay V.M.  
The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript  
*J. Biol. Chem.* (2003), **278**, 15991-15997
32. Bousif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P.  
A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo* : Polyethylenimine.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995), **92**, 7297-7301
33. Boutla A., Kalantidi K., Tavernarakis N., Tsagris M., Tabler M.  
Induction of RNA interference in *Caenorhabditis elegans* by RNAs derived from plants exhibiting post-transcriptional gene silencing  
*Nucleic Acids Res.* (2002), **30**, 1688-1694
34. Braasch D.A., Jensen S., Liu Y., Kaur K., Arar K., White M.A., Corey D.R.  
RNA Interference in Mammalian Cells by Chemically-Modified RNA  
*Biochemistry* (2003), **42**, 7967-7975
35. Braasch D.A., Paroo Z., Constantinescu A., Ren G., Oz O.K., Mason R.P., Corey D.R.  
Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2004), **14** (5), 1139-1143
36. Bragonzi A., Boletta A., Biffi A., Muggia A., Sersale G., Cheng S.H., Bordignon C., Assael B.M., Conese M.  
Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs.  
*Gene Ther.* (1999), **6**, 1995-2004
37. Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R.  
Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference  
*Cancer Cell* (2002), **2**, 243-247
38. Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R.  
A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells  
*Science* (2002), **296**, 550-553

## C

39. Caplen N.J., Zheng Z., Falgout B., Morgan R.A.  
Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference  
*Mol. Ther.* (2002), **6**, 243-251
40. Cejka D., Losert D., Wacheck V.  
Short interfering RNA (siRNA) : tool or therapeutic ?  
*Clin. Sci.* (2006), **110**, 47-58
41. Cerutti L., Mian N., Bateman A.  
Domains in gene silencing and cell differentiation proteins : the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain  
*Trends Biochem. Sci.* (2000), **10**, 481-482
42. Chiu Y.L., Rana T.M.  
siRNA function in RNAi : A chemical modification analysis  
*RNA* (2003), **9**, 1034-1048
43. Chu T.C., Twu K.R., Ellington A.D., Levy M.  
Aptamer mediated siRNA delivery  
*Nucleic Acids Res.* (2006), **34**, e73

44. Clinical Trials – A service of the U.S. National Institute of Health  
<http://clinicaltrials.gov>
45. Cogoni C., Irelan J.T., Schumacher M., Schmidhauser T.J., Selker E.U., Macino G.  
Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation  
*EMBO J.* (1996), **15**, 3153-3163
46. Cogoni C., Macino G.  
Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase  
*Nature* (1999), **399**, 166-169
47. Czauderna F., Fechtner M., Dames S., Aygün H., Klippel A., Pronk G.J., Giese K., Kaufmann J.  
Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells  
*Nucleic Acids Res.* (2003), **31** (11), 2705-2716

## D

48. Dallas A., Vlassov A.V.  
RNAi : A novel antisense technology and its therapeutic potential  
*Med. Sci. Monit.* (2006), **12** (4), RA67-74
49. Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Angell S., Baulcombe D.C.  
An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus  
*Cell* (2000), **101**, 543-553
50. Dauty E., Remy J.S., Zuber G., Behr J.P.  
Intracellular Delivery of Nanometric DNA Particles via the Folate Receptor  
*Bioconjug. Chem.* (2002), **13**, 831-839
51. Davidson T.J., Harel S., Arboleda V.A., Prunell G.F., Shelanski M.L., Greene L.A., Troy C.M.  
Highly Efficient Small Interfering RNA Delivery to Primary Mammalian Neurons Induces MicroRNA-Like Effects before mRNA Degradation  
*J. Neurosci.* (2004), **24** (45), 10040-10046
52. De Carvalho F., Niebel F., Frendo P., Van Montagu M., Cornelissen M.  
Post-transcriptional co-suppression of  $\beta$ -1,3-glucanase genes does not affect accumulation of transgene nuclear mRNA  
*Plant Cell* (1995), **7**, 347-358
53. De Fougerolles A., Vornlocher H.P., Maraganore J., Lieberman J.  
Interfering with disease : a progress report on siRNA-based therapeutics  
*Nat. Rev. Drug Discov.* (2007), **6**, 443-453
54. De Martimprey H., Bertrand J.R., Fusco A., Santoro M., Couvreur P., Vauthier C., Malvy C.  
siRNA nanoformulation against the Ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an *in vivo* model of papillary thyroid carcinoma  
*Nucleic Acids Res.* (2008), **36**, e2
55. De Paula D., Bentley M.V.L.B., Mahato R.I.  
Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting  
*RNA* (2007), **13**, 431-456
56. Derossi D., Chassing G., Prochiantz A.  
Trojan peptides: the penetration system for intracellular delivery  
*Trends Cell Biol.* (1998), **8**, 84-87
57. DeVincenzo J., Cehelsky J.E., Alvarez R., Elbashir S., Harborth J., Toudjarska I., Nechev L., Murugaiah V., Van Vliet A., Vaishnav A.K., Meyers R.  
Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV)  
*Antiviral Res.* (2008), **77**, 225-231

58. Ding Y., Lawrence C.E.  
A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction  
*Nucleic Acids Res.* (2003), **31**, 7280-7301
59. Dittgen T., Nimmerjahn A., Komai S., Livznernski P., Waters J., Margrie T.W., Helmchen F., Denk W., Brecht M., Osten P.  
Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring *in vivo*  
*Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2004), **101**, 18206-18211
60. Donis-Keller H.  
Site specific enzymatic cleavage of RNA  
*Nucleic Acids Res.* (1979), **7**, 179-192
61. Drin G., Cottin S., Blanc E., Rees A.R., Tamsamani J.  
Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides  
*J. Biol. Chem.* (2003), **278**, 31192-31201
62. Dubey P.K., Mishra V., Jain S., Mahor S., Vyas S.P.  
Liposomes modified with cyclic RGD peptide for tumor targeting  
*J. Drug Targeting* (2004), **12**, 257-264
63. Duxbury M.S., Matros E., Ito H., Zinner M.J., Ashley S.W., Whang E.E.  
Systemic siRNA-mediated gene silencing : a new approach to targeted therapy of cancer  
*Ann. Surg.* (2004), **240**, 667-674
64. Dykxhoorn D.M., Novina C.D., Sharp P.A.  
Killing the messenger : Short RNAs that silence gene expression  
*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2003), **4**, 457-467

## E

65. El-Andaloussi S., Holm T., Langel U.  
Cell-penetrating peptides : mechanisms and applications  
*Curr. Pharm. Des.* (2005), **11**, 3597-3611
66. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T.  
Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells  
*Nature* (2001), **411**, 494-498
67. Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T.  
RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs  
*Genes Dev.* (2001), **15**, 188-200
68. Elbashir S.M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T.  
Functional anatomy of siRNA for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate  
*EMBO J.* (2001), **20**, 6877-6888
69. Elbashir S.M., Harborth J., Weber K., Tuschl T.  
Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs  
*Methods* (2002), **26**, 199-213
70. Elmen J., Thonberg H., Ljungberg K., Frieden M., Westergaard M., Xu Y., Wahren B., Liang Z., Orum H., Koch T., Wahlestedt C.  
Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality  
*Nucleic Acids Res.* (2005), **33** (1), 439-447

## F

71. Fedorov Y., Anderson E.M., Birmingham A., Reynolds A., Karpilow J., Robinson K., Leake D., Marshall W.S., Khvorova  
Off-targets effects by siRNA can induce toxic phenotype  
*RNA* (2006), **12**, 1188-1196

72. Felgner J.H., Kumar R., Sridhar C.N., Wheeler C.J., Tsai Y.J., Border R., Ramsey P., Martin M., Felgner P.L.  
Enhanced Gene Delivery and Mechanism Studies with a Novel Series of Cationic Lipid Formulations  
*J. Biol. Chem.* (1994), **269** (4), 2550-2561
73. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.  
Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*  
*Nature* (1998), **391**, 806-811
74. Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B., Krieglstein J., Kissel T.  
*In vitro* cytotoxicity testing of polycations : influence of polymer structure on cell viability and hemolysis  
*Biomaterials* (2003), **24**, 1121-1131
75. Flynn M.A., Casey D.G., Todrik S.M., Mahon B.  
Efficient delivery of small interfering RNA for inhibition of IL-12p40 expression *in vivo*  
*J. Inflamm.* (2004), **1** (1) : 4
76. Friedrich I., Shir A., Klein S., Levitzki A.  
RNA molecules as anti-cancer agents  
*Semin. Cancer Biol.* (2004), **14**, 223-230

## G

77. Gaucheron J., Santaella C., Vierling P.  
Highly Fluorinated Lipospermines for Gene Transfer : Synthesis and Evaluation of Their *in vitro* Transfection Efficiency.  
*Bioconjug. Chem.* (2001), **12** (1), 114-128
78. Ge Q., Filip L. Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J.  
Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004), **101** (23), 8676-8681
79. Genlantis  
How To Choose the Optimal Gene Delivery Method [en ligne]  
Disponible sur : [http://www.genlantis.com/commerce/staticwebpage.jsp?param=transfection\\_articles\\_3](http://www.genlantis.com/commerce/staticwebpage.jsp?param=transfection_articles_3)  
(consulté le 28.10.2004)
80. Giladi H., Ketzinel-Gilad M., Rivkin L., Felig Y., Nussbaum O., Galun E.  
Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus in mice by RNA interference  
*Mol. Ther.* (2003), **8**, 769-776
81. Gilmore I.R., Fox S.P., Hollins A.J., Sohail M., Akhtar S.  
The Design and Exogenous Delivery of siRNA for Post-transcriptional Gene Silencing  
*J. Drug Target.* (2004), **12** (6), 315-340
82. Gitlin L., Andino R.  
Nucleic Acid-Based Immune System : the Antiviral Potential of Mammalian RNA Silencing  
*J. Virol.* (2003), **77** (13), 7159-7165
83. Golzio M., Mazzolini L., Moller P., Rols M.P., Teissié J.  
Inhibition of gene expression in mice muscle by *in vivo* electrically mediated siRNA delivery  
*Gene Ther.* (2004), **12**, 246-251
84. Grayson A.C.R., Doody A.M., Putnam D.  
Biophysical and Structural Characterization of Polyethylenimine-Mediated siRNA Delivery *in vitro*  
*Pharm. Res.* (2006), **23** (8), 1868-1876
85. Grewal S., Moazed D.  
Heterochromatin and Epigenetic Control of Gene Expression  
*Science* (2003), **301**, 798-802

86. Grimm D., Streetz K.L., Jopling C.L., Storm T.A., Pandey K., Davis C.R., Marion P., Salazar F., Kay M.A.  
Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways  
*Nature* (2006), **441**, 537-541
87. Guo S., Kemphues K.J.  
*par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed  
*Cell* (1995), **81**, 611-620
88. Gurzov E.N., Izquierdo M.  
RNA interference against *Hec1* inhibits tumor growth *in vivo*  
*Gene Ther.* (2005), **13**, 1-7
89. Guzman H.R., McNamara A.J., Nguyen D.X., Prausnitz M.R.  
Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration: a unified explanation based on cell-to-bubble ratio and blast radius  
*Ultrasound Med. Biol.* (2003), **29**, 1211-1222

## H

90. Hacein-Bey-Abina S., von Kalle C., Schmidt M., LeDeist F., Wulffraat N., McIntyre E., Radford I., Villeval J.L., Fraser C.C., Cavazzana-Calvo M., Fischer A.  
A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency  
*N. Engl. J. Med.* (2003), **348**, 255-256
91. Hagstrom J. E., Hegge J., Zhang G., Noble M., Budker V., Lewis D.L., Herweijer H., Wolff J.A.  
A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs  
*Mol. Ther.* (2004), **10**, 386-398
92. Halder J., Kamat A.A., Landen C.N., Han L.Y., Lutgendorf S.K., Lin Y.G., Merritt W.M., Jennings N.B., Chavez-Reyes A., Coleman R.L., Gershenson D.M., Schmandt R., Cole S.W., Lopez-Berestein G., Sood A.K.  
Focal adhesion kinase targeting using *in vivo* short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy  
*Clin. Cancer Res.* (2006), **12**, 4916-4924
93. Hall A.H., Wan J., Shaughnessy E.E., Ramsay Shaw B., Alexander K.A.  
RNA interference using boranophosphate siRNAs : structure-activity relationships  
*Nucleic Acids Res.* (2004), **32**, 5991-6000
94. Hamilton A.J., Baulcombe D.C.  
A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants  
*Science* (1999), **286**, 950-952
95. Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.  
An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cell extracts  
*Nature* (2000), **404**, 293-296
96. Harborth J., Elbashir S.M., Bechert K., Tuschl T., Weber K.  
Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs  
*J. Cell Sci.* (2001), **114**, 4557-4565
97. Harborth J., Elbashir S.M., Vandeburgh K., Manninga H., Scaringe S.A., Weber K., Tuschl T.  
Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing  
*Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* (2003), **13**, 83-105
98. Hassani Z., Lemkine G.F., Erbacher P., Palmier K., Alfama G., Giovannangeli C., Behr J.P., Demeinex B.A.  
Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels  
*J. Gene Med.* (2005), **7**, 198-207

99. He L., Hannon G.J.  
MicroRNAs : small RNAs with a big role in gene regulation  
*Nat. Rev. Genet.* (2004), **5**, 522-531
100. Heidel J.D., Yu Z., Liu J.Y.C., Rele S.M., Liang Y., Zeidan R.K., Kornbrust D.J., Davis M.E.  
Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2007), **104** (14), 5715-5721
101. Heitz E.  
Das heterochromatin der Moose  
*Jehrb. Wiss. Botanik* (1928), **69**, 762-818
102. Hennig W.  
Heterochromatin  
*Chromosoma* (1999), **108**, 1-9
103. Herschlag D.  
Implications of ribozyme kinetics for targeting the cleavage of specific RNA molecules *in vivo*: more isn't always better  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991), **88**, 6921-6925
104. Holen T., Amarzougououi M., Wilger M., Babaie E., Prydz H.  
Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor  
*Nucleic Acids Res.* (2002), **30**, 1757-1766
105. Hollins A.J., Omid Y., Benter I.F., Akhtar S.  
Toxicogenomics of drug delivery systems: Exploiting delivery system-induced changes in target gene expression to enhance siRNA activity  
*J. Drug Target.* (2007), **15**, 83-88
106. Howard K.A., Rahbek U.L., Liu X., Damgaard C.K., Glud S.Z., Andersen M.O., Hovgaard M.B., Schmitz A., Nyengaard J.R., Besenbacher F., Kjems J.  
RNA Interference *in vitro* and *in vivo* Using a Chitosan/siRNA Nanoparticle System  
*Mol. Ther.* (2006), **14**, 476-484
107. Hu S., Heidel J.D., Barlett D.W., *et al*  
Systemic targeted EWS-FLI1 siRNA abrogates growth of metastases in a murine Ewing's tumor model.  
*Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* (2005), **46**, A6104
108. Hu-Lieskovan S., Heidel J.D., Bartlett D.W., Davis M.E., Triche T.J.  
Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma  
*Cancer Res.* (2005), **65**, 8984-8992
109. Hutvagner G., Zamore P.D.  
A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme-complex  
*Science* (2002), **297**, 2056-2060
110. Hwa Kim S., Hoon Jeong J., Chul Cho K., Wan Kim S., Gwan Park T.  
Target-specific gene silencing by siRNA plasmid DNA complexed with folate-modified poly(ethylenimine)  
*J. Controlled Release* (2005), **104**, 223-232

1-1

111. Inoue A., Takahashi K.A., Mazda O., Terauchi R., Arai Y., Kishida T., Shin-Ya M., Asada H., Morihara T., Tomomura H., Ohashi S., Kajikawa Y., Kawahito Y., Imanishi J., Kawata M., Kubo T.  
Electro-transfer of small interfering RNA ameliorated arthritis in rats  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005), **336**, 903-908

112. Izant J.G., Weintraub H.  
Inhibition of thymidine kinase gene-expression by anti-sense RNA : A molecular approach to genetic analysis  
*Cell* (1984), **36**, 1007-1015
113. Jackson A.L., Burchard J., Leake D., Reynolds A., Schelter J., Guo J., Johnson J.M., Lim L., Karpilow J., Nichols K., Marshall W., Khvorova A., Linsley P.S.  
Position-specific chemical modification of siRNAs reduces off-target transcript silencing  
*RNA* (2006), **12**, 1197-1205
114. Janowski B.A., Huffman K.E., Schwartz J.C., Ram R., Hardy D., Shames D.S., Minna J.D., Corey D.R.  
Inhibiting gene expression at transcription start sites in chromosomal DNA with antigene RNAs  
*Nat. Chem. Biol.* (2005), **1**, 216-222
115. Jiang Z., Zhao P., Zhou Z., Liu J., Qin L., Wang H.  
Using Attenuated Salmonella Typhi as Tumor Targeting Vector for MDR1 siRNA Delivery  
*Cancer Biol. Ther.* (2007), **6**, (4), 555-560
116. Jones L., Ratcliff F., Baulcombe D.C.  
RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance  
*Curr. Biol.* (2001), **11**, 747-757
117. Judge A.D., Sood V., Shaw J.R., Fang D., McClintock K., MacLachlan I.  
Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA  
*Nat. Biotechnol.* (2005), **23** (4), 457-462
118. Juliano R., Alam M.R., Dixit V., Kang H.  
Mechanisms and strategies for effective delivery of antisens and siRNA oligonucleotides  
*Nucleic Acids Res.* (2008), **36**, 4158-4171

## K

119. Kang H., DeLong R., Fisher M.H., Juliano R.L.  
Tat-conjugated PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense and siRNA oligonucleotides  
*Pharm. Res.* (2005), **22**, 2099-2106
120. Kariko K., Bhuyan P., Capodici J., Weissman D.  
Small Interfering RNAs Mediate Sequence-Independent Gene Suppression and Induce Immune Activation by Signaling through Toll-Like Receptor 3  
*J. Immunol.* (2004), **172**, 6545-6549
121. Katas H., Alpar H.O.  
Development and characterization of chitosan nanoparticles for siRNA delivery  
*J. Control Release* (2006), **115**, 216-225
122. Kawakami S., Hashida M.  
Targeted Delivery Systems of Small Interfering RNA by Systemic Administration  
*Drug Metab. Pharmacokinet.* (2007), **22** (3), 142-151
123. Kawasaki H., Taira K.  
Short hairpin type of dsRNA that are controlled by tRNA<sup>Val</sup> promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells  
*Nucleic Acids Res.* (2003), **31**, 700-707
124. Kennerdell J.R., Carthew R.X.  
Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA  
*Nat. Biotechnol.* (2000), **17**, 896-898
125. Ketting R.F., Haverkamp T.H., van Luenen H.G., Plasterk R.H.  
*mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD  
*Cell* (1999), **99**, 133-141

126. Kim D.H., Behlke M.A., Rose S.D., Chang M.S., Choi S., Rossi J.J.  
Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy  
*Nat. Biotechnol.* (2005), **23**, 222-226
127. Kim D.H., Rossi J.J.  
Strategies for silencing human disease using RNA interference  
*Nat. Rev. Genet.* (2007), **8**, 173-184
128. Kim H.J., Greenleaf J.F., Kinnick R.R., Bronck J.T., Bolander M.E.  
Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells  
*Hum. Gene Ther.* (1996), **7** (11), 1339-1346
129. Kim T.W., Lee J.H., He L., Boyd D.A., Hardwick J.M., Hung C.F. et al.  
Modification of professional antigen-presenting cells with small interfering RNA vivo to enhance cancer vaccine potency.  
*Cancer Res.* (2005), **65** (1), 309-316
130. Kim W.J., Christensen L.V., Jo S., Yockman J.W., Jeong J.H., Kim Y.H., Kim S.W.  
Cholesteryl Oligoarginine Delivering Vascular Endothelial Growth Factor siRNA Effectively Inhibits Tumor Growth in Colon Adenocarcinoma  
*Mol. Ther.* (2006), **14**, 343-350
131. Kinoshita M., Hynynen K.  
A novel method for the intracellular delivery of siRNA using microbubble-enhanced focused ultrasound  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005), **335**, 393-399
132. Kishida T., Asada H., Gojo S., Ohashi S., Shin-Ya M., Yasutomi K., Terauchi R., Takahashi K.A., Kubo T., Imanishi J., Mazda O.  
Sequence-specific gene silencing in murine muscle induced by electroporation-mediated transfer of short interfering RNA  
*J. Gene Med.* (2004), **6**, 105-110
133. Kitabwalla M., Ruprecht R.M.  
RNA Interference – A New Weapon against HIV and Beyond  
*N. Engl. J. Med.* (2002), **347** (17), 1364-1367
134. Kopatz I., Remy J.S., Behr J.P.  
A model for non-viral gene delivery : through syndecan adhesion molecules and powered by actin.  
*J. Gene Med.* (2004), **6** (7), 769-776
135. Koping-Hoggard M., Köping-Höggard M., Tubulekas I., Guan H., Edwards K., Nilsson M., Varum K.M., Artursson P.  
Chitosan as a nonviral gene delivery system : structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine *in vitro* and after lung administration *in vivo*  
*Gene Ther.* (2001), **8**, 1108-1121
136. Kretschmer-Kazemi Far R., Sczakiel G.  
The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility : a comparison with antisense oligonucleotides  
*Nucleic Acids Res.* (2003), **31**, 4417-4424
137. Krieg A.M., Stein C.A.  
Phosphorothioate oligodeoxynucleotides : antisense or anti-protein ?  
*Antisense Res. Dev.* (1995), **5**, 241
138. Kumar P., Wu H., McBride J.L., Jung K.E., Kim M.H., Davidson B.L., Lee S.K., Shankar P., Manjunath N.  
Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system  
*Nature* (2007), **448**, 39-43
139. Kurreck J.  
RNA Interference : From Basic Research to Therapeutic Applications  
*Angew. Chem. Int. Ed.* (2009), **48**, 1378-1398

140. Kутtenkeuler D., Boutros M.  
Genome-wide RNAi as a route to gene function in *Drosophila*. *Brief Funct Genomic Proteomic* (2004), **3** (2), 168-176
141. Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D.  
Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias  
*Cell* (2003), **115**, 209-216
- L**
142. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T.  
Identification of novel genes coding for small expressed RNAs  
*Science* (2001), **294**, 853-858
143. Lee N.S., Dohjima T., Bauer G., Li H., Li M.J., Ehsani A., Salvaterra P., Rossi J.  
Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells  
*Nat. Biotechnol.* (2002), **20**, 500-505
144. Lee R.C., Ambros V.  
An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*  
*Science* (2001), **294**, 862-864
145. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Rådmark O., Kim S., Kim V.N.  
The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing  
*Nature* (2003), **425**, 415-419
146. Leem – Les Entreprises du Médicament  
www.leem.org
147. Leung R.K.M., Whittaker P.A.  
RNA interference : from gene silencing to gene-specific therapeutics  
*Pharmacol. Ther.* (2005), **107**, 222-239
148. Lewis D.L., Hagstrom J.E., Loomis A.G., Wolff J.A., Herweijer H.  
Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice  
*Nat. Genet.* (2002), **32**, 107-108
149. Lewis D.L., Wolff J.A.  
Systemic siRNA delivery via hydrodynamic intravascular injection  
*Adv. Drug Deliv. Rev.* (2007), **59**, 115-123
150. Li C.X., Parker A., Menocal E., Xiang S., Borodyansky L., Fruehauf J.H.  
Delivery of RNA Interference  
*Cell Cycle* (2006), **5** (18), 2103-2109
151. Li H., Fu X., Chen Y., Hong Y., Tan Y., Cao H., Wu M., Wang H.  
Use of adenovirus-delivered siRNA to target oncoprotein p28GANK in hepatocellular carcinoma  
*Gastroenterology* (2005), **128**, 2029-2041
152. Li M.J., Kim J., Li S., Zaia J., Yee J.K., Anderson J., Akkina R., Rossi J.J.  
Long-Term Inhibition of HIV-1 Infection in Primary Hematopoietic Cells by Lentiviral Vector Delivery of a Triple Combination of Anti-HIV shRNA, Anti-CCR5 Ribozyme, and a Nucleolar-Localizing TAR Decoy  
*Mol. Ther.* (2005), **12** (5), 900-909
153. Lim L.P., Lau N.C., Weinstein E.G., Abdelhakim A., Yekta S., Rhoades M.W., Burge C.B., Bartel D.P.  
The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*  
*Genes Dev.* (2003), **17**, 991-1008
154. Lipardi C., Wei Q., Paterson B.M.  
RNAi as random degradative PCR : siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs  
*Cell* (2001), **107**, 297-307

155. Lippman Z., Martienssen R.  
The role of RNA interference in heterochromatic silencing  
*Nature* (2004), **431**, 364-370
156. Little S.J., Holte S., Routy J.P., Daar E.S., Markowitz M., Collier A.C., Koup R.A., Mellors J.W., Connick E., Conway B., Kilby M., Wang L., Whitcomb J.M., Hellmann N.S., Richman D.D.  
Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV  
*N. Engl. J. Med.* (2002), **347**, 385-394
157. Liu F., Song Y., Liu D.  
Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA  
*Gene Ther.* (1999), **6**, 1258-1266
158. Liu Q., Rand T.A., Kalidas S., Du F., Kim H.E., Smith D.P., Wang X.  
R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway  
*Science* (2003), **301**, 1921-1925
159. Liu X., Howard K.A., Dong M., Andersen M.O., Rahbek U.L., Johnsen M.G., Hansen O.C., Besenbacher F., Kjems J.  
The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing  
*Biomaterials* (2007), **28**, 1208-1288
160. Lorenz C., Hadwiger P., John M., Vornlocher H.P., Unverzagt C.  
Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2004), **14**, 4975-4977
161. Lundberg P., El-Andaloussi S., Sützlü T., Johansson H., Langel Ü.  
Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides  
*FASEB J.* (2007), **21**, 2664-2671
162. Luo D., Saltzman W.M.  
Synthetic DNA delivery systems  
*Nat. Biotechnol.* (2000), **18**, 33-37
163. Luo M.C., Zhang D.Q., Ma S.W., Huang Y.Y., Shuster S.J., Porreca F., Lai J.  
An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons  
*Mol. Pain* (2005), **1**, 29

## M

164. Ma Z., Li J., He F., Wilson A., Pitt B., Li S.  
Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2005), **330**, 755-759
165. MacKenzie T.C., Kobinger G.P., Kootstra N.A., Radu A., Sena-Esteves M., Bouchard S., Wilson J.M., Verma I.M., Flake A.W.  
Efficient transduction of live rand muscle after in utero injection of lentiviral vectors with different pseudotypes  
*Mol. Ther.* (2002), **6**, 349-358
166. Maeda Y., Fukushima K., Nishizaki K., Smith R.J.  
*In vitro* and *in vivo* suppression of GJB2 expression by RNA interference  
*Hum. Mol. Genet.* (2005), **14**, 1641-1650
167. Mahat R.I., Monera O.D., Smith L.C., Rolland A.  
Peptide-based gene delivery  
*Curr. Opin. Mol. Ther.* (1999), **1**, 226-243
168. Mand M.T., Plasterk R.H.A.  
Dicer at RISC : the mechanism of RNAi  
*Cell* (2004), **117**, 1-3
169. Manoharan M.  
RNA interference and chemically modified small interfering RNAs  
*Curr. Opin. Chem. Biol.* (2004), **8**, 570-579

170. Martin S.E., Caplen N.J.  
Applications of RNA Interference in Mammalian Systems  
*Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* (2007), **8**, 81-108
171. Martinez J., Tuschl T.  
RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease  
*Genes Dev.* (2004), **18**, 975-980
172. Matsuda T., Cepko C.L.  
Electroporation and RNA interference in the rodent retina *in vivo* and *in vitro*  
*Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2004), **101** (1), 16-22
173. Mattick J.S.  
Non-coding RNAs : the architects of eukaryotic complexity  
*EMBO Rep.* (2001), **2**, 986-991
174. McCaffrey A.P., Meuse L., Pham T.T., Conklin D.S., Hannon G.J., Kay M.A.  
RNA interference in adult mice  
*Nature* (2002), **418**, 38-39
175. McManus M.T., Sharp P.A.  
Gene silencing in mammals by small interfering RNAs  
*Nat. Rev. Genet.* (2002), **3**, 737-747
176. McManus M.T., Petersen C.P., Haines B.B., Chen J., Sharp P.A.  
Gene silencing using micro-RNA designed hairpins  
*RNA* (2002), **8**, 842-850
177. McNamara J.O., Andrechek E.R., Wang Y., Viles K.D., Rempel R.E., Gilboa E., Sullenger B.A., Giangrande P.H.  
Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras  
*Nat. Biotechnol.* (2006), **24**, 1005-1015
178. Mello C.C., Conte Jr D.  
Revealing the world of RNA interference  
*Nature* (2004), **431**, 338-342
179. Merdan T., Kopecek J., Kissel T.  
Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer.  
*Adv. Drug. Deliv. Rev.* (2002), **54**, 715-758
180. Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M.A., Matzke A.  
Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA  
*EMBO J.* (2000), **19**, 5194-5201
181. Meyerhoff A.  
U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis  
*Clin. Infect. Dis.* (1999), **28**, 42-48
182. Minakuchi Y. Takeshita F., Kosaka N., Sasaki H., Yamamoto Y., Kouno M., Honma K., Nagahara S., Hanai K., Sano A., Kato T., Terada M., Ochiya T.  
Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*  
*Nucleic Acids Res.* (2004), **32**, e109
183. Miyagishi M., Taira K.  
U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells  
*Nat. biotechnol.* (2002), **20**, 497-500
184. Moore M.D., McGarvey M.J., Russell R.A., Cullen B.R., McClure M.O.  
Stable inhibition of hepatitis B virus proteins by small interfering RNA expressed from viral vectors  
*J. Gene Med.* (2005), **7**, 918-925

185. Moore V., Dunnion D., Irwin W.J., Akhtar S.  
Interactions of hydrophobic oligonucleotide conjugates with the dipeptide transporter in Caco-2 cells  
*Biochem. Pharmacol.* (1997), **53**, 1223-1228
186. Morrissey D.V., Lockridge J.A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartsough K., Machemer L., Radka S., Jadhav V., Vaish N., Zinnen S., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C.S., Jeffs L.B., Judge A., MacLachlan I., Polisky B.  
Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs  
*Nat. Biotechnol.* (2005), **23** (8), 1002-1007
187. Moser H.E., Dervan P.B.  
Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation  
*Science* (1987), **238**, 645-650
188. Muratovska A., Eccles M.R.  
Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells  
*FEBS Lett.* (2004), **558**, 63-68
189. Myers J.W., Jones J.T., Meyer T., Ferrell J.E.  
Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing  
*Nat. Biotechnol.* (2003), **21**, 324-328

## N

190. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R.  
Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans  
*Plant Cell* (1990), **2**, 279-289
191. Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H.  
Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields  
*EMBO J.* (1982), **1**, 841-845
192. Nimjee S.M., Rusconi C.P., Sullenger B.A.  
Aptamers : an emerging class of therapeutics  
*Annu. Rev. Med.* (2005), **56**, 555-583
193. Ngo H., Tschudi C., Gull K., Ullu E.  
Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998), **95**, 14687-14692
194. Nguyen T., Menocal E.M., Harhorth J., Fruehauf J.H.  
RNAi therapeutics : An update on delivery  
*Curr. Opin. Mol. Ther.* (2008), **10** (2), 158-167
195. Nouredini S.C., Curiel D.T.  
Genetic targeting strategies for adenovirus  
*Mol. Pharm.* (2005), **2**, 341-347
196. Novina C.D., Sharp P.A.  
The RNAi revolution  
*Nature* (2004), **430**, 161-164
197. Nucleonics Inc  
[www.nucleonicsinc.com](http://www.nucleonicsinc.com)
198. Nykänen A., Haley N., Zamore P.D.  
ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway  
*Cell* (2001), **107**, 309-321

## O-P

199. Ohana P., Gofrit O., Ayesb S., Al-Sharel W., Mizrahi A., Birman T., Schneider T., Matouk I., De Groot N., Tavdy E., Sidi A.A., Hochberg A.  
Regulatory sequences of the H19 gene in DNA based therapy of bladder cancer  
*Gene Ther. Mol. Biol.* (2004), **8**, 181-192
200. Okamura K., Ishizuka A., Siomi H., Siomi, M.C.  
Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways  
*Genes Dev.* (2004), **18**, 1655-1666
201. Oku N., Yamashita S., Sakuragi N., Doi K., Okada S., Shimidzu K., Sumi M., Nadai T., Kusumoto S., Suda Y.  
Therapeutic efficacy of 5-fluorouracil prodrugs using endogenous serum proteins as drug carriers : a new strategy in drug delivery system  
*Biol. Pharm. Bull.* (1995), **18**, 181-184
202. Omid Y., Hollins A.J., Benboutera M., Drayton R., Benter I.F., Akhtar S.  
Toxicogenomics of non-viral vectors for gene therapy : a microarray study of lipofectin- and oligofectamine-induced gene expression changes in human epithelial cells  
*J. Drug Target.* (2003), **11**, 311-323
203. Ong S.T., Li F., Du J., Tan Y.W., Wang S.  
Hybrid cytomegalovirus Enhancer-H1 promoter-based plasmid and baculovirus vectors mediate effective RNA interference  
*Hum. Gene Ther.* (2005), **16**, 1404-1412
204. OPKO Health Inc  
www.opko.com
205. Osada H., Tatematsu Y., Yatabe Y., Horio Y., Takahashi T.  
ASH1 gene is a specific therapeutic target for lung cancers with neuroendocrine features  
*Cancer Res.* (2005), **65**, 10680-10685
206. Oupicky D., Ogris M., Howard K.A., Dash P.R., Ulbrich K., Seymour L.W.  
Importance of lateral and steric stabilization of polyelectrolyte gene delivery vectors for extended systemic circulation  
*Mol. Ther.* (2002), **5**, 463-472
207. Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., Hannon G.J., Conklin D.S.  
Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells  
*Genes Dev.* (2002), **16**, 948-958
208. Palliser D., Chowdhury D., Wang Q.Y., Lee S.J., Bronson R.T., Knipe D.M., Lieberman J.  
An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection  
*Nature* (2006), **439**, 89-94
209. Paroo Z., Corey D.R.  
Challenges for RNAi *in vivo*  
*Trends Biotechnol.* (2004), **22** (8), 390-394
210. Paterson B.M., Roberts B.E., Kuff E.L.  
Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1977), **74**, 4370-4374
211. Peer D., Zhu P., Carman C.V., Lieberman J., Shimaoka M.  
Selective gene silencing in activated leukocytes by targeting siRNAs to the integrin lymphocyte function-associated antigen-1  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2007), **104** (10), 4095-4100
212. Pickford A.S., Cogoni C.  
RNA-mediated gene silencing  
*Cell. Mol. Life Sci.* (2003), **60**, 871-882

213. Plasterk R.H.A.  
RNA Silencing : The Genome's Immune System  
*Science* (2002), **296**, 1263-1265
214. Puthenveetil S., Whitby L., Ren J., Kelnar K., Krebs J.F., Beal P.A.  
Controlling activation of the RNA-dependent protein kinase by siRNAs using site-specific chemical modification  
*Nucleic Acids Res.* (2006), **34**, 4900-4911

## Q-R

215. Quark Pharmaceuticals  
www.quarkpharma.com
216. Radhakrishnan S., Layden T.J., Gartel A.L.  
RNA interference as a new strategy against viral hepatitis  
*Virology* (2004), **323**, 173-181
217. Rädler J.O., Koltover I., Salditt T., Safinya C.R.  
Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes : DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes  
*Science* (1997), **275**, 810-814
218. Relph K.L., Harrington K.J., Pandha H.  
Adenoviral strategies for the gene therapy of cancer  
*Semin. Oncol.* (2005), **32**, 573-582
219. Remy J.S., Abdallah B., Zanta M.A., Boussif O., Behr J.P., Demeneix B.  
Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines  
*Adv. Drug Deliv. Rev.* (1998), **30**, 85-95
220. Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W.S., Khvorova A.  
Rational siRNA design for RNA interference  
*Nat. biotechnol.* (2004), **22** (3), 326-330
221. Reynolds A., Anderson A.M., Vermeulen A., Fedorov Y., Robinson K., Leake D., Karpilow J., Marshall W.S., Khvorova A.  
Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent  
*RNA* (2006), **12**, 988-993
222. Richard J.P., Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M.J., Chernomordik L.V., Lebleu B.  
Cell-penetrating peptides: a reevaluation of the mechanism of cellular uptake  
*J. Biol. Chem.* (2003), **278**, 585-590
223. Romano N., Macino G.  
Quelling : transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences  
*Mol. Microbiol.* (1992), **6**, 3343-3353
224. Rondinone C.M.  
RNAi for the Identification of New Targets for the Treatment of Metabolic Diseases  
*Endocrinology* (2006), **147**, 2650-2656
225. Ruiz M.T., Voinnet O., Baulcombe D.C.  
Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing  
*Plant Cell* (1998), **10**, 937-946

## S

226. Sanchez Alvarado A., Newmark P.A.  
Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), **96**, 5049-5054

227. Sarathi M., Simon M.C., Venkatesan C., Sahul Hameed A.S.  
Oral Administration of Bacterially Expressed VP28dsRNA to Protect *Penaeus monodon* from White Spot Syndrome Virus  
*Mar. Biotechnol.* (2008), **10**, 242-249
228. Scanlon K.J.  
Anti-Genes : siRNA, Ribozymes and Antisense  
*Curr. Pharm. Biotechnol.* (2004), **5**, 415-420
229. Schiffelers R.M., Ansari A., Xu J., Zhou Q., Tang Q., Storm G., Molema G., Lu P.Y., Scaria P.V., Woodle M.C.  
Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle  
*Nucleic Acids Res.* (2004), **32** (19), e149
230. Schramke V., Allshire R.  
Hairpin RNAs and Retrotransposon LTRs Effect RNAi and Chromatin-Based Gene Silencing  
*Science* (2003), **301**, 1069-1074
231. Schwarz D.S., Hutvagner G., Haley B., Zamore P.D.  
Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways  
*Mol. Cell* (2002), **10**, 537-548
232. Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.D.  
Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex  
*Cell* (2003), **115**, 199-208
233. Sebestyen M.G., Budker V.G., Budker T., Subbotin V.M., Zhang G., Monahan S.D., Lewis D.L., Wong S.C., Hagstrom J.E., Wolff J.A.  
Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules  
*Gene Med.* (2006), **8**, 852-873
234. Shankar P., Manjunath N., Lieberman J.  
The Prospect of Silencing Disease Using RNA Interference  
*JAMA* (2005), **293**, 1367-1373
235. Sijen T., Fleenor J., Simmer F., Thijssen K.L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R.H., Fire A.  
On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing  
*Cell* (2001), **107**, 465-476
236. Simeoni F., Morris M.C., Heitz F., Divita G.  
Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG : implications for delivery of siRNA into mammalian cells  
*Nucleic Acids Res.* (2003), **31** (11), 2717-2724
237. Singer O., Marr R.A., Rockenstein E., Crews L., Coufal N.G., Gage F.H., Verma I.M., Masliah E.  
Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model  
*Nat. Neurosci.* (2005), **8**, 1343-1349
238. Sledz C.A., Holko M., De Veer M.J., Silverman R.H., Williams B.R.G.  
Activation of the interferon system by short-interfering RNAs  
*Nat. Cell Biol.* (2003), **5** (9), 834-839
239. Smardon A., Spoerke J.M., Stacey S.C., Klein M.E., Mackin N., Maine E.M.  
EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*  
*Curr. Biol.* (2000), **10**, 169-178
240. Smith C.J.S., Watson C.F., Bird C.R., Ray J., Schoch W., Grierson D.  
Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of endogenous gene in transgenic plants  
*Mol. Gen. Genet.* (1990), **224**, 477-481

241. Song E., Zhu P., Lee S.K., Chowdhury D., Kussman S., Dykxhoorn D.M., Feng Y., Palliser D., Weiner D.B., Shankar P., Marasco W.A., Lieberman J.  
Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors  
*Nat. Biotechnol.* (2005), **23** (6), 709-717
242. Song E., Lee S.K., Wang J., Ince N., Ouyang N., Min J., Chen J., Shankar P., Lieberman J.  
RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis  
*Nat. Med.* (2003), **9** (3), 347-351
243. Sorensen D.R., Leirdal M., Sioud M.  
Gene Silencing by Systemic Delivery of Synthetic siRNAs in Adult Mice  
*J. Mol. Biol.* (2003), **327**, 761-766
244. Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R.K., Racie T., Rajeev K.G., Röhl I., Toudjarska I., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Koteliansky V., Limmer S., Manahoran M., Vornlocher H.P.  
Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs  
*Nature* (2004), **432**, 173-178
245. Spagnou S., Miller A.D., Keller M.  
Lipidic Carriers of siRNA : Differences in the Formulation, Cellular Uptake, and Delivery with Plasmid DNA  
*Biochemistry* (2004), **43**, 13348-13356
246. Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R., Silverman R.H., Schreiber R.D.  
How cells respond to interferons  
*Annu. Rev. Biochem.* (1998), **67**, 227-264
247. Stein P., Svoboda P., Anger M., Schultz R.M.  
RNAi : mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase  
*RNA* (2003), **9**, 187-192
248. Storz G.  
An expanding universe of non-coding RNAs  
*Science* (2002), **296**, 1260-1263
249. Suh J., Paik H.J., Hwang B.K.  
Ionization of poly(ethylenimine) and poly(allylamine) at various pH's  
*Bioorg. Chem.* (1994), **22** (3), 318-327
250. Suzuki T., Futaki S., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y.  
Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides  
*J. Biol. Chem.* (2002), **277**, 2437-2443

## T

251. Tabara H., Grishok A., Mello C.  
RNAi in *C. elegans* : soaking in the genome sequence  
*Science* (1998), **282**, 430-431
252. Tabara H., Sarkissian M., Kelly W.G., Fleenor J., Grishok A., Timmons L., Fire A., Mello C.C.  
The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*  
*Cell* (1999), **99**, 123-132
253. Takabatake Y., Isaka Y., Mizui M., Kawachi H., Shimizu F., Ito T., Hori M., Imai E.  
Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease  
*Gene Ther.* (2005), **12** (12), 965-973
254. Takei Y., Kadomatsu K., Yuzawa Y., Matsuo S., Muramatsu T.  
A Small Interfering RNA Targeting Vascular Endothelial Growth Factor as Cancer Therapeutics  
*Cancer Res.* (2004), **64**, 3365-3370

255. Takeshita F., Minakuchi Y., Nagahara S., Honma K., Sasaki H., Hirai K., Teratani T., Namatame N., Yamamoto Y., Hanai K., Kato T., Sano A., Ochiya T.  
Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen *in vivo*  
*Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* (2005), **102**, 12177-12182
256. Tavernarakis N., Wang S.L., Dorovkov M., Ryazanov A., Driscoll M.  
Heritable and inducible interference by double-stranded RNA encoded by transgenes  
*Nat. Genet.* (2000), **24**, 180-183
257. The Nobel Assembly at Karolinska Institutet  
The Noble Prize in Physiologie or Medicin 2006 [en ligne]  
Disponible sur : <http://nobelprize.org> (consulté le 24.07.2007)
258. Thomas C.E., Ahrhardt A., Kay M.A.  
Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy  
*Nat. Rev. Genet.* (2003), **4**, 346-358
259. Tijsterman M., Ketting R.F., Plasterk R.H.  
The genetics of RNA silencing  
*Annu. Rev. Genet.* (2002), **36**, 489-519
260. Timmons L., Fire A.  
Specific interference by ingested dsRNA  
*Nature* (1998), **395**, 854
261. Timmons L., Court D.L., Fire A.  
Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*  
*Gene* (2001), **263**, 103-112
262. Tomalia D.A., Reyna L.A., Svenson S.  
Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging  
*Biochem. Soc. Trans.* (2007), **35**, 61-67
263. Tomar R.S., Matta H., Chaudhary P.M.  
Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA  
*Oncogene* (2003), **22**, 5712-5715
264. Tompkins S.M., Lo C.Y., Tumpey T.M., Epstein S.L.  
Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004), **101** (23), 8682-8686
265. Toumi H., Hegge J., Subbotin V., Noble M., Herweijer H., Best T.M., Hagstrom J.E.  
Rapid intravascular injection into limb skeletal muscle : a damage assessment study  
*Mol. Ther.* (2006), **13**, 229-236
266. Tousignant J.D., Gates A.L., Ingram L.A. Johnson C.L., Nietupski J.B., Cheng S.H., Eastman S.J., Scheule R.K.  
Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice  
*Hum. Gene Ther.* (2000), **11**, 2493-2513
267. TransDerm Inc  
[www.transderm.org](http://www.transderm.org)

## U-V

268. Urban-Klein B., Werth S., Abuharbeid S., Czubayko F., Aigner A.  
RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA *in vivo*  
*Gene Ther.* (2005), **12**, 461-466
269. Usman N.  
From target validation to therapeutics with RNAi  
[www.currentdrugdiscovery.com](http://www.currentdrugdiscovery.com) (april 2004)

270. Usui I., Imamura T., Huang J., Satoh H., Olefsky J.M.  
Cdc42 is a Rho GTPase family member that can mediate insulin signaling to glucose transport in 3T3-L1 adipocytes  
*J. Biol. Chem.* (2003), **278**, 13765-13774
271. Van der Krol A.R., Mur L.A., Beld M., Mol J.N., Stuitje A.R.  
Flavonoid genes in *Petunia* : addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression  
*Plant Cell* (1990), **2**, 291-299
272. Van de Water F.M., Boerman O.C., Wouterse A.C., Peters J.G., Russel F.G., Masereeuw R.  
Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules  
*Drug Metab. Dispos.* (2006), **34**, 1393-1397
273. Vangasseri D.P., Han S.J., Huang L.  
Lipid-protamine-DNA-mediated antigen delivery  
*Curr. Drug Deliv.* (2005), **2**, 401-406
274. Verdel A., Jia S., Gerber S., Sugiyama T., Gygi S., Grewal S.I., Moazed D.  
RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex  
*Science* (2004), **303**, 672-676
275. Verma U.N., Surabhi R.M., Schmaltieg A., Becerra C., Gaynor R.B.  
Small interfering RNA directed against beta-catenine inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells  
*Clin. Cancer Res.* (2003), **9**, 1291-1300
276. Vickers T.A., Koo, S., Bennett, C.F., Crooke, S.T., Dean, N.M., Baker, B.F  
Efficient reduction of target RNAs by siRNA and RNase H dependent antisense agents : a comparative analysis  
*J. Biol. Chem.* (2003), **278**, 7108-7118
277. Voinnet O., Vain P., Angell S., Baulcombe D.C.  
Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA  
*Cell* (1998), **95**, 177-187

## W-X

278. Wagner E.  
Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery  
*Adv. Drug Deliv. Rev.* (1999), **38**, 279-289
279. Wagner E., Zenke M., Cotten M., Beug H., Birnstiel M.L.  
Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990), **87**, 3410-3414
280. Walder R.Y., Walder J.A.  
Role of RNase H in Hybrid-Arrested Translation by Antisense Oligonucleotides  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988), **85**, 5011-5015
281. Wall N.R., Shi Y.  
Small RNA : can RNA interference be exploited for therapy ?  
*Lancet* (2003), **362**, 1401-1403
282. Wassenegger M., Heimes S., Riedel L., Sanger H.L.  
RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants  
*Cell* (1994), **76**, 567-576
283. Waterhouse P., Graham M.W., Wang M.B.  
Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998), **95**, 13959-13964

284. Waterhouse P.M., Wang M.B., Lough T.  
Gene silencing as an adaptative defence against viruses  
*Nature* (2001), **411**, 834-842
285. Whittaker P.A.  
Genes for asthma: much ado about nothing?  
*Curr. Opin. Pharmacol.* (2003), **3** (3), 212-219
286. Wianny F., Zernicka-Goetz M.  
Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development  
*Nat. Cell Biol.* (2000), **2**, 70-75
287. Wikipédia, l'encyclopédie libre  
<http://fr.wikipedia.org>
288. Xia H., Mao Q., Paulson H.L., Davidson B.L.  
siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*  
*Nat. Biotechnol.* (2002), **20**, 1006-1010
289. Xia H., Mao Q., Eliason S.L., Harper S.Q., Martins I.H., Orr H.T., Paulson H.L., Yang L., Kotin R.M., Davidson B.L.  
RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia  
*Nat. Med.* (2004), **10**, 816-820

## Y-Z

290. Yang D., Buchholz F., Huang Z., Goga A., Chen C.Y., Brodsky F.M., Bishop J.M.  
Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells  
*Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2002), **99**, 9942-9947
291. Yiu S.M., Wong P.W.H., Lam T.W., Mui Y.C., Kung H.F., Lin M., Cheung Y.T.  
Filtering of Ineffective siRNAs and Improved siRNA Design Tool  
*Bioinformatics* (2005), **21** (2), 144-151
292. Yoo H., Sazani P., Juliano R.L.  
PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense oligonucleotides  
*Pharm. Res.* (1999), **16**, 1799-1804
293. Yu J.Y., DeRuiter S.L., Turner D.L.  
RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells  
*Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2002), **99**, 6047-6052
294. Zambrowicz B.P., Turner C.A., Sands A.T.  
Predicting drug efficacy: knockouts model pipeline drugs of the pharmaceutical industry  
*Curr. Opin. Pharmacol.* (2003), **3** (5), 563-570
295. Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P.  
RNAi : double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals  
*Cell* (2000), **101**, 25-33
296. Zamore P.D.  
Thirty-three years later, a glimpse at the ribonuclease III active site  
*Mol. Cell* (2001), **8**, 1158-1160
297. Zanta M.A., Boussif O., Adib A., Behr J.P.  
*In vitro* Gene Delivery to Hepatocytes with Galactosylated Polyethylenimine  
*Bioconjug. Chem.* (1997), **8** (6), 839-844
298. Zaric V., Weltin D., Erbacher P., Remy J.S., Behr J.P., Stephan D.  
Effective polyethylenimine-mediated gene transfer into human endothelial cells  
*J. Gene Med.* (2004), **6**, 176-184

299. Zaug A.J., Cech T.R.  
The intervening sequence RNA of Tetrahymena is an enzyme  
*Science* (1986), **231**, 470-475
300. Zelphati O., Szoka F.C.  
Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids  
*Pharm. Res.* (1996), **13** (9), 1367-1372
301. Zeng Y., Cullen B.R.  
RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm  
*RNA* (2002), **8**, 855-860
302. Zhang G., Budker V., Wolff J.A.  
High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA  
*Hum. Gene Ther.* (1999), **10**, 1735-1737
303. Zhang L., Nolan E., Kreitschitz S., Rabussay D.P.  
Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive *in vivo* electroporation  
*Biochim. Biophys. Acta* (2002), **1572**, 1-9
304. Zhang S.Z., Pan F.Y., Xu J.F., Yuan J., Guo S.Y., Dai G., Xue B., Shen W.G., Wen C.J., Zhao D.H., Li C.J.  
Knockdown of *c-Met* by adenovirus-delivered small interfering RNA inhibits hepatocellular carcinoma growth *in vitro* and *in vivo*  
*Mol. Cancer Ther.* (2005), **4**, 1577-1584
305. Zhou J., Wu J., Hafdi N., Behr J.P., Erbacher P., Peng L.  
PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing  
*Chem. Commun.* (2006), **22**, 2362-2364
306. Zimmermann T.S., Lee A.C.H., Akinc A., Bramlage B., Bumcrot D., Fedoruk M.N., Harborth J., Heyes J.A., Jeffs L.B., John M., Judge A.D., Lam K., McClintock K., Nechev L.V., Palmer L.R., Racie T., Röhl I., Seiffert S., Shanmugam S., Sood V., Soutschek J., Toudjarska I., Wheat A.J., Yaworski E., Zedalis W., Kotliansky V., Manoharan M., Vornlocher H.P., MacLachlan I.  
RNAi-mediated gene silencing in non-human primates  
*Nature* (2006), **441**, 111-114

**N° d'identification :**

**TITRE**

**L'ARN INTERFERENCE,  
L'EMERGENCE D'UNE NOUVELLE STRATEGIE THERAPEUTIQUE**

**Thèse soutenue le 5 juin 2009**

**Par Gaëlle CREUSAT**

**RESUME**

L'ARN interférence est un processus cellulaire naturel découvert récemment par Andrew Fire et Craig Mello. Ils ont mis en évidence un mécanisme très conservé chez les eucaryotes, qui aboutit à l'extinction post-transcriptionnelle de l'expression de gènes cibles à la suite de la présence d'ARN double brin dans le cytoplasme des cellules.

Compte tenu du caractère naturel de ce mécanisme, l'extinction obtenue est très robuste et spécifique, ce qui fait de l'ARN interférence un système révolutionnaire pour étudier la fonction des gènes, valider de potentielles cibles thérapeutiques et même développer de nouvelles thérapeutiques, par exemple dans les domaines de l'oncologie ou de la virologie.

Malgré tout, il reste un obstacle majeur à l'utilisation courante de l'ARNi : disposer d'une technique efficace de délivrance des siRNA. En effet, pour des applications thérapeutiques chez l'homme, on rencontre des problèmes de stabilité, de biodistribution, de ciblage et de pénétration cellulaire des siRNA ; tout cela implique le recours à des systèmes de transfection.

Grâce aux efforts de recherche mis en oeuvre dans le domaine, des essais cliniques ont déjà pu débiter, notamment pour traiter des pathologies oculaires ou des infections virales.

**MOTS CLES**

- ARN interférence, siRNA  
- inhibition post-transcriptionnelle  
- transfection  
- essais cliniques

<b>Directeurs de thèse</b>	<b>Intitulé du laboratoire</b>	<b>Nature</b>
Professeur Chantal Finance Faculté de Pharmacie, Nancy	Groupe d'Etude des Vecteurs Supramoléculaires du Médicament	<b>Expérimentale</b> <input type="checkbox"/>
M. Jean-Serge Remy, DR Faculté de Pharmacie, Illkirch	Chimie Génétique UMR CNRS-UdS 7199	<b>Bibliographique</b> <input checked="" type="checkbox"/>
		<b>Thème</b> <b>3-5</b>

**THEMES**

1 – Sciences fondamentales  
2 – Hygiène/Environnement  
3 – Médicament  
4 – Alimentation – Nutrition  
5 - Biologie  
6 – Pratique professionnelle