

Panorama du saut d'exon

Luis Garcia, PhD

Chercheur CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Inserm UMR787

Institut de Myologie, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris

L'ARNm, une cible thérapeutique issue des progrès de la génétique moléculaire

La possibilité de synthétiser de courtes séquences d'acides nucléiques simples brins (oligonucléotides synthétiques) capables de s'hybrider avec les ADN ou les ARN cellulaires a profondément révolutionné les moyens d'investigations des biologistes. Cette technologie s'est révélée déterminante à l'avènement des méthodes de séquençage à la fin des années 70 et un peu plus tard de la PCR (*polymerase chain reaction*) permettant l'amplification *in vitro* de segments d'ADN à des fins analytiques, de clonages ou de diagnostics. A la même époque, la découverte que les hybrides ADN:ARN étaient rapidement détruits par une enzyme cellulaire, la RNase H, montrait qu'il était possible d'éteindre sélectivement la production d'une protéine en ciblant son ARNm par un oligonucléotide ADN simple brin complémentaire encore appelé « antisens » (AON). Dès lors, l'ARNm devenait une cible thérapeutique à part entière. De tels AON (ADN simples brins antisens) sont aujourd'hui utilisés dans certains traitements antiviraux et antitumoraux, mais cette approche semble sur le déclin depuis l'émergence de nouvelles stratégies d'interaction/inhibition de l'ARNm fondées sur l'ARN interférence (RNAi) ou les ribozymes, beaucoup plus efficaces.

L'organisation du gène DMD et la structure modulaire de la dystrophine : un cas d'école pour le saut d'exon à visée thérapeutique

Sitôt découvert le gène DMD, les généticiens établirent que la gravité des conséquences de délétions dans le gène de la dystrophine n'était pas conditionnée par leur étendue mais par l'impact sur le cadre de lecture de l'ARNm final, compatible ou non avec la production d'une certaine quantité de dystrophine, même amputée de domaines que l'on sait aujourd'hui dispensables. De très grandes délétions pouvaient n'entraîner qu'un tableau clinique peu sévère si le cadre de lecture était préservé (myopathie de Becker - BMD). Ceci s'expliquait par le fait que la distribution des 11 055 nucléotides de la séquence codante sur les 79 exons du gène DMD ne coïncidait pas nécessairement avec le découpage en triplets (codons). Ainsi, l'essor du génotypage et la constitution des premières bases de données génétiques laissèrent entrevoir la possibilité théorique de rétablir un ARNm fonctionnel chez certains patients par l'exclusion d'un ou plusieurs exons si la phase locale s'y prêtait.

Cette chirurgie de l'ARNm ne fut rendue possible qu'à la fin des années 90 par la synthèse d'analogues AON résistants à la RNase H. Il était alors possible de masquer des motifs impliqués dans la maturation des pré-ARNm par des AON synthétiques sans provoquer leur destruction (2'-O-méthyl phosphorothioates, PNA, morpholinos...). Les biologistes avaient à leur disposition des outils moléculaires leur permettant de générer les variants protéiques « à façon » issus d'un épissage alternatif forcé et/ou éliminer des exons porteurs de mutations. C'est ce qu'on a appelé aujourd'hui le saut d'exon (*exon skipping*). Les AON synthétiques ne sont pas les seules molécules capables de réaliser de telles modifications et plusieurs équipes ont montré depuis qu'il était également possible de

véhiculer les séquences antisens dans de petits ARN nucléaires (snRNA U7, U1) dont la fonction naturelle est de participer à la maturation des ARNm. Ici, l'antisens est synthétisé dans la cellule elle-même à partir d'un mini-gène qui en assure la production.

Les limites de la stratégie du saut d'exon

L'objectif visé par le saut d'exon est d'obtenir un taux suffisant de transcrit lisible (ARNm) pour aboutir à une quantité de protéine fonctionnelle capable de contrecarrer le processus pathologique. Comme la dystrophine finale est amputée d'un ou plusieurs exons, on peut prédire qu'elle se comportera comme une dystrophine de type Becker. Cette assertion est étayée sur les phénotypes Becker modérés, observés chez les malades dont la délétion est identique à celle qui serait obtenue par saut d'exon. Autrement dit, dans la majorité des cas, il s'agit d'obtenir la transformation d'un phénotype DMD très sévère, en phénotype BMD.

Les bases de données du type UMD-DMD, développée par Christophe Bérout, permettent de sélectionner instantanément les cas éligibles pour un saut d'exon. Ces bases renferment des centaines de cas documentés au point de vue moléculaire, biologique et clinique, et fournissent automatiquement pour chaque cas tous les paramètres requis : (1) conséquences directes de toute mutation sur le cadre de lecture ; (2) tous profils d'épissage qui seraient correcteurs de la phase ; (3) taille de la dystrophine résultante ; (4) domaines protéiques et épitopes qui seraient amputés ; (5) carte des cibles à viser par les séquences antisens pour obtenir un saut efficace. Si l'on s'en tient au saut d'un seul exon, 43 % de l'effectif total des patients figurant dans ces bases seraient éligibles (83 % si l'on ne tient compte que de la population présentant une grande délétion ≥ 1 exon). Il faut néanmoins souligner qu'il s'agirait d'une thérapeutique à la carte, c'est-à-dire spécifique d'allèle. Les exons à faire sauter sont de fréquence très inégale : avec 6 exons (45, 53, 51, 44, 50 et 8), on pourrait corriger 85 % des délétions hors-phases (pour corriger 100 % des cas éligibles, il faudrait cibler en tout 22 exons). Pour la correction des petites mutations, le problème se complique par la grande diversité des exons à cibler et les très faibles effectifs. Pour ces cas difficiles, une stratégie de saut simultané de plusieurs exons est cependant envisageable. A titre d'exemple, l'excision du segment 45-55 permettrait en théorie d'inclure tous les patients affectés dans ce segment, quelle que soit leur mutation (2/3 de la population des patients DMD). Enfin, les cas qui ne sauraient être accessibles au saut d'exon sont ceux affectant le contrôle du gène (promoteur), le premier ou le dernier exon, et enfin des domaines déterminants pour la fonction de la dystrophine.

Les essais cliniques

Deux essais cliniques (phase 1) sont en cours : le premier aux Pays-Bas (injection intramusculaire de 2'-O-méthyl phosphorothioates), le second au Royaume-Uni (injection intramusculaire de morpholinos). Les résultats du premier essai ont confirmé le potentiel de cette approche et l'étape suivante consistera à délivrer le principe actif à l'ensemble de la musculature. Les travaux menés sur la souris mdx et le chien GRMD laissent supposer que ces molécules peuvent être administrées par voie systémique, intra-péritonéale ou sous-cutanée. En revanche, nous avons peu de recul sur les effets secondaires consécutifs à des expositions récurrentes à ces molécules qui se trouvent être peu ou pas biodégradables et risquent de s'accumuler dans les noyaux cellulaires. Le recours à de petits ARN nucléaires (snRNA) U7 et U1 pour véhiculer les séquences antisens est également très prometteur. L'efficacité de ces snRNA est spectaculaire chez la souris mdx et le chien GRMD. Le traitement semble pérenne et non toxique. Cependant, l'introduction de ces snRNA antisens au cœur des fibres musculaires nécessite d'utiliser des vecteurs de gène en grande quantité.

En conclusion

Le saut d'exon semble une des pistes des plus prometteuses pour le traitement de DMD. Plusieurs systèmes se sont révélés efficaces et pertinents (oligos synthétiques et snRNA) sur des modèles animaux. Il leur faut maintenant passer le cap des développements cliniques et parfois des développements industriels requis pour l'élaboration en qualité et en quantité de ces produits. Il est également crucial de développer des méthodes d'administrations systémiques appropriées permettant d'obtenir un adressage généralisé à tous les muscles, en particulier aux muscles respiratoires et cardiaque, et une bonne tolérance pharmacologique et immunologique.

10/07