



INSTITUT DE FRANCE  
Académie des sciences

---

*Séance solennelle de remise des Prix le 15 novembre 2005*

« Les ARN interférents . une nouvelle clé pour comprendre le génome »

par Nicole M. Le Douarin  
Secrétaire Perpétuelle de l'Académie des sciences

Au cours des quelques dernières années, des recherches menées tout d'abord sur les plantes puis sur *Caenorhabditis elegans*, un petit ver de quelques millimètres, affectionné des biologistes, ont conduit à des découvertes que l'on peut qualifier de sensationnelles tant elles étaient inattendues et tant les mécanismes cellulaires qu'elles révèlent bouleversent nos certitudes.

Il s'agit de l'existence dans la cellule de molécules d'acide ribonucléique ou ARN enroulées sur elles-mêmes en une double hélice semblable à celle bien connue que forme dans le noyau l'ADN, support du patrimoine héréditaire.

S'il ne s'était s'agit que de la présence dans la cellule d'ARN double brin, comme on le désigne désormais, la découverte aurait pu rester confidentielle. Mais l'histoire est fort intéressante car ces ARN double brin sont capables d'interférer avec le fonctionnement des gènes. De ce fait, ils bousculent le dogme central de la biologie moléculaire et sont de plus, un moyen utilisé par de nombreux organismes pour lutter contre les infections virales.

Pour saisir le bouleversement qu'apportent ces notions nouvelles, il faut se rappeler que la grande aventure scientifique commencée en 1953 avec la révélation de la structure chimique de l'ADN a été si spectaculaire et a apporté aux questions fondamentales que pose la vie des réponses si satisfaisantes qu'on a cru pour un temps que le chapitre le plus crucial de la Biologie était, en quelque sorte, un chapitre clos.

Comme le rappelle l'historien des sciences, Horace Judson, dans un livre qui porte un titre suggestif : "The eighth day of Creation", "Le 8<sup>e</sup> jour de la Création", l'histoire de cette découverte s'est déroulée en trois actes.

Le premier a consisté à révéler la structure en fibre et en double hélice de l'acide désoxyribonucléique, l'ADN, constitué par une succession de 4 unités ou nucléotides, dont l'ordre détermine sous forme d'un "code", l'*information* qui confère aux espèces leurs propriétés et aux individus leur caractère unique.

Le second a permis de montrer qu'un autre acide nucléique, l'ARN (acide ribonucléique), joue le rôle d'intermédiaire depuis l'ADN du noyau jusqu'au cytoplasme de la cellule où se fait la synthèse des **protéines**, constituants majeurs de la matière vivante qu'il n'est pas exagéré de tenir pour les effecteurs universels des fonctions vitales. **C'est l'ARN messenger.**

Enfin, le troisième allait révéler la manière dont s'inscrit au sein de l'ADN la nature des protéines : les nucléotides sont réunis **en triplets**, ou **codons** qui dictent l'ordre dans lequel les acides aminés seront placés dans la chaîne protéique.

Non seulement les gènes, dont l'existence était depuis longtemps connue, mais dont on avait jusqu'alors ignoré la composition exacte, devenaient une réalité concrète, mais plus frappant encore pour l'imagination, leur permanence, qui assure la transmission des caractères héréditaires à travers les générations, était expliquée par le mode de reproduction à l'identique de la molécule d'ADN à chaque division cellulaire.

La biologie moléculaire, née au début des années 1950 paraissait arrivée vingt ans plus tard à une sorte de conclusion.

Jacques Monod, un des théoriciens de la biologie moléculaire à qui un journaliste posait la question de savoir quand serait vraiment révélé " le secret de la vie ", (ici je cite Horace Judson) répondait il y a plus de trente ans déjà d'un air plutôt surpris : " le secret de la vie ? Mais en principe, nous connaissons déjà le secret de la vie ".

Au problème de la construction d'un organisme complexe à partir d'une unique cellule, l'œuf, la solution proposée est que l'ADN renferme, codé, le programme du développement de l'embryon. La différenciation des cellules qui permet le fonctionnement des organismes multicellulaires est le résultat de l'activité sélective et différentielle des gènes selon le type cellulaire considéré. Celle-ci est réglée par des protéines, ou facteurs de transcription dont la découverte remonte aux travaux sur la régulation effectués sur les bactéries par Jacques Monod et François Jacob.

Ainsi, le dogme central du fonctionnement du vivant repose sur la trilogie **ADN-ARNm-protéines**. Elle en est le socle sur lequel repose la vie, ses propriétés uniques et ses formes multiples.

#### **Dans cette trilogie, l'ADN est roi.**

Cet enthousiasme pour le gène et son contrôle universel de tous les aspects du vivant a atteint son apogée en 2000 lorsqu'a eu lieu la publication de la première séquence complète du génome humain.

Pour **Walter Gilbert**, un des inventeurs d'une méthode de séquençage de l'ADN, les données obtenues par cette démarche sont le "**Graal de la génétique humaine**". Il est vrai que ce qu'on pouvait en attendre est considérable : on allait découvrir la cause des maladies héréditaires, ainsi que la manière de les corriger ; mettre en évidence l'origine des susceptibilités génétiques aux infections et à divers dérèglements physiologiques (comme le diabète par exemple) ; on allait comprendre le cancer, le développement des organismes, leur mode de fonctionnement et aussi éclairer le problème de l'évolution des êtres vivants.

Les effets d'annonce n'ont pas manqué pour soutenir l'effort considérable qu'a représenté, le séquençage du génome humain. En fait l'objectif initial a été atteint plus tôt que prévu, le séquençage de l'ADN en effet s'est automatisé et, maintenant que la technologie est disponible, on l'applique à de nombreuses espèces animales et végétales ce qui permet d'avancer à grands pas dans l'étude de modèles biologiques très divers.

*Donc avec le décryptage du génome et notamment du génome humain, on croyait avoir en mains les clés du trésor de la vie. Il s'est avéré qu'elles étaient loin d'ouvrir toutes les serrures qui protègent les secrets du vivant.*

Plusieurs surprises attendaient en effet les biologistes moléculaires. Alors qu'on imaginait la présence chez l'homme d'au moins 100 000 gènes, le décryptage de la séquence complète de l'ADN n'en a révélé tout d'abord que 30 000 au plus, nombre qui après un examen plus approfondi se situerait plutôt autour de 25 000.

Plus curieux encore, en regard de la diversité des espèces vivantes, les recherches intensives menées depuis les grandes révélations des années 1950 à 1970, ont montré que les

mêmes systèmes géniques sont à l'œuvre pour accomplir diverses tâches dans des espèces aussi éloignées qu'une mouche, une souris ou un homme.

A un niveau plus global, il est apparu que les gènes de la souris sont à 90% similaires à ceux de l'Homme. Le 1<sup>er</sup> septembre 2005, la séquence de l'ADN du chimpanzé, publiée dans la revue "Nature", se révèle être à plus de 99% la même que celle de l'ADN humain.

En somme, le nombre de gènes est réduit et ils paraissent peu variés si l'on considère la diversité des fonctions qu'ils ont à accomplir et l'immense variabilité des formes vivantes. C'est donc dans la **régulation** de leur activité et dans les interactions qui s'exercent entre les gènes eux-mêmes et leurs produits, qu'il faut chercher le secret de leurs multiples fonctions.

Une autre donnée dont on avait déjà conscience mais qui a été confirmée et précisée par le séquençage du génome est que les gènes ne représentent, chez nombre de Métazoaires et notamment chez les Mammifères, qu'une part très réduite du volume du génome. De 1 à 3% seulement. Le reste de l'ADN est dit "**non codant**" car il n'est pas composé de ces triplets de nucléotides signifiants pour la synthèse des protéines.

Faute de leur trouver un rôle, ces ADN non codants, qui représentent la grande majorité du génome, ont été qualifiés du terme péjoratif de *Junk DNA* ou ADN inutile.

Enfin, malgré les progrès considérables accomplis au cours de la seconde moitié du 20<sup>e</sup> siècle où les recherches guidées par le dogme central ont été très actives et fructueuses, certaines questions fondamentales de la biologie restent encore sans réponse. On ne comprend toujours pas comment le génome contrôle la morphogenèse, en d'autres termes comment le génotype (l'information codée dans la molécule linéaire d'ADN) se traduit, à l'issue du développement embryonnaire, par la forme des êtres vivants, leur organisation en trois dimensions et comment s'installe la complexité des tissus et organes qui conditionnent leur fonctionnement. De surcroît, les mécanismes fondamentaux de la différenciation cellulaire demeurent encore très largement énigmatiques.

En somme des problèmes centraux que l'on pensait pouvoir résoudre rapidement après les grandes découvertes de la biologie moléculaire sont encore posés et des avancées non moins importantes sont sans aucun doute à attendre pour faire de nouveaux pas décisifs vers le secret de la Vie.

A cet égard il semble bien que la biologie moléculaire soit entrée ces dernières années dans une ère nouvelle. Un champ de recherche inattendu s'est ouvert en génétique : le schéma dans lequel l'ADN occupe une position centrale, bien que gardant toute sa validité, doit depuis quelques années réserver une place plus grande à l'autre catégorie d'acides nucléiques, les ARN.

Il est apparu que les ARN sont beaucoup plus diversifiés qu'on ne le pensait. A côté de l'ARN messager, il existe dans les cellules de tous les eucaryotes une grande quantité d'ARN non codants provenant de la transcription de zones d'ADN jusque-là considérées comme inutiles parce qu'elles ne participent pas directement à la synthèse des protéines. Ils jouent un rôle majeur dans la régulation de l'activité des gènes.

Le mécanisme nouvellement découvert, qu'on nomme *interférence de l'ARN*, est aussi appelé en anglais **RNA-silencing**, ce qui illustre directement l'idée que ces ARN peuvent réduire d'une manière spécifique des gènes au silence.

Leurs actions consistent, entre autres, à interférer avec le fonctionnement canonique du gène, en empêchant la traduction de l'ARN messager en protéine. Ces ARN interférents, capables de contrôler d'une manière séquence-spécifique l'activité des gènes, ouvrent des horizons nouveaux par les applications qu'ils laissent entrevoir tant en recherche fondamentale qu'en médecine.

L'interférence de l'ARN a été observée dans une grande variété d'espèces, les plantes, les vers, les unicellulaires, les insectes et les vertébrés, y compris l'homme. Ce mécanisme n'a pas été trouvé chez bactéries (ou Procaryotes). Il s'agit donc d'une innovation des Eucaryotes. On estime que ce mécanisme était déjà à l'œuvre il y a 1 milliard 600 millions d'années.

Cette permanence au cours de l'évolution indique l'importance qu'il revêt dans la survie et le fonctionnement des organismes. En effet l'interférence de l'ARN protège ce que les espèces ont de plus précieux, leur code génétique. Il est le moyen de lutte le plus efficace dont disposent les êtres unicellulaires, les végétaux, les champignons et les animaux inférieurs pour rendre inactif le matériel génétique des agents infectieux, parasites, bactéries ou virus qui s'introduisent dans leurs cellules. Il joue en fait le rôle d'un véritable système immunitaire intracellulaire, en particulier pour les plantes.

C'est en travaillant sur les mécanismes moléculaires de la coloration des fleurs de pétunia qu'en 1990 Richard Jorgensen de l'Université d'Arizona fit une observation étonnante qui devait être le révélateur d'un mécanisme cellulaire inconnu jusqu'alors.

La couleur rose-mauve des pétunias est le résultat de l'action d'une enzyme la *chalcone synthase*. La perte de fonction plus ou moins complète de ce gène produit une perte plus ou moins accentuée de la pigmentation de la fleur. Jorgensen a cherché à obtenir des fleurs colorées plus vivement en ajoutant, par transgénèse, des copies supplémentaires du gène de la chalcone synthase au génome de la plante. A leur grande surprise les fleurs des pétunias ainsi traités étaient totalement blanches. L'excès du gène et par conséquent de l'ARN messager correspondant à l'enzyme avait provoqué chez la plante hôte un phénomène correcteur qui consistait à rendre silencieux non seulement l'ADN injecté mais aussi l'ADN endogène codant pour la chalcone synthase. C'est ce que Jorgensen avait qualifié de "co-suppression" en 1990 sans pouvoir en déterminer le mécanisme moléculaire précis. Il fallut attendre 1998 et les travaux de Andrew Fire du Carnegie Institute de Washington pour qu'une explication de ce phénomène soit proposée et que la notion d'interférence par l'ARN soit introduite. Andrew Fire, qui travaillait sur le ver *Caenorhabditis elegans* tentait de provoquer l'extinction d'un gène particulier (le gène *par1*) dont il connaissait l'existence sans en connaître la fonction. Il utilisa pour cela une technique classique qui consiste à injecter dans l'animal l'ARN complémentaire à l'ARN messager codé par ce gène. Du fait même de leur complémentarité moléculaire, ces deux brins d'ARN s'unissent alors dans une double hélice comme le font les deux brins complémentaires de la molécule d'ADN dans le noyau. L'ARN messager ne peut alors plus remplir son rôle et aucune protéine n'est synthétisée.

Les expériences bien faites doivent comporter un contrôle qui renforce leur pertinence. La surprise vint de ce que le blocage était tout aussi efficace lorsqu'un excès de l'ARN messager lui-même était introduit alors qu'on attendait évidemment une augmentation de la production de la protéine. Plus curieux encore, l'ARN messager uni à son brin complémentaire, formant ainsi un **ARN double brin** introduit dans l'animal s'est révélé exercer une inhibition totale du fonctionnement effectif du gène considéré.

*Il était clair qu'on avait là à faire avec un phénomène nouveau, non prévu par les connaissances de la biologie moléculaire en 1998.*

On a trouvé ensuite que l'ARN double brin, qu'il soit introduit expérimentalement dans la cellule, comme dans le cas décrit ici, ou par une infection virale ou encore qu'il soit produit par la cellule elle-même, déclenche un mécanisme enzymatique très puissant. Celui-ci élimine tous les ARN de la même famille, présents dans la cellule. Pour qu'ils soient actifs, les ARN double brin doivent être coupés en petits fragments de 21 à 24 nucléotides, appelés petits ARN interférents. Ceux-ci, dans un complexe enzymatique particulier, sont capables de reconnaître, toujours par complémentarité moléculaire, puis de détruire, l'ARN messager qui leur correspond.

Chez certains organismes, ces petits ARN interférents ne sont pas détruits après avoir accompli leur œuvre. A l'inverse, ils sont multipliés par une enzyme *ad hoc* et envahissent l'organisme entier.

C'est le cas chez les plantes où l'amplification de ce mécanisme de défense est responsable de la résistance de la plante entière à l'infection virale. Il s'agit d'une sorte d'autovaccination.

Chez le ver *Caenorhabditis elegans*, le mécanisme de la dispersion n'est pas totalement élucidé mais on sait que ces petits ARN interférents peuvent même être transmis à la lignée germinale et, par conséquent, passer d'une génération à l'autre avec la protection antivirale qui leur est associée.

x  
x                      x

La capacité de l'ARN interférent à être transmis à la totalité de l'organisme du ver a été mise à profit par les chercheurs. On peut en effet transfecter des bactéries avec des ARN double brin capables de détruire le produit d'un gène donné. Si ces bactéries servent de nourriture à des vers, ces ARN sont libérés et infectent pratiquement toutes les cellules du ver où ils inhibent l'activité du gène ciblé. Cela permet de faire, sur cet animal modèle, des expériences de transgénèse pour réduire au silence n'importe quel gène dont on connaît la séquence. On constate alors les perturbations qui résultent du silence du gène étudié, dont elles révèlent ainsi, comme en négatif, les fonctions qu'il assume lorsqu'il est actif. Etant donné que, comme je l'ai dit il y a un instant, les séquences des gènes sont très conservées dans tout le règne animal, on peut obtenir par ce moyen des renseignements éventuellement transposables aux Vertébrés et à l'Homme. Il s'agit donc d'une méthode puissante de recherche en génétique et physiologie. Elle est actuellement utilisée non seulement dans ce modèle du ver *Caenorhabditis elegans* mais aussi très largement dans d'autres espèces comme la *Drosophile* par exemple.

x  
x                      x

A côté des ARN double brin et de l'extinction post-transcriptionnelle des gènes, ainsi démontrée, les chercheurs ont découvert d'autres petits ARN appelés **micro ARN** qui sont fabriqués par la cellule elle-même à partir de son propre génome. Ces **micro ARN** proviennent de gènes passés jusque là totalement inaperçus parce qu'ils font partie de l'ADN non codant réputé inutile que j'ai évoqué il y a un instant.

Les micro ARN interférents **endogènes**, qui utilisent le même système enzymatique que l'ARN double brin, ont pour rôle d'inhiber la synthèse protéique en se liant à l'ARN messager qui ne peut dès lors remplir son rôle.

Les premiers micro ARN qui ont été découverts sont impliqués dans la régulation de la chronologie du développement de l'embryon chez *Coenorhabditis elegans*.

Depuis, on en a trouvé un grand nombre d'autres, non seulement chez le ver, mais dans tous les organismes multicellulaires où ils ont été recherchés. On évalue leur nombre dans le génome humain à plusieurs centaines et leur fonction reste pour la plupart à élucider.

Grâce à des travaux réalisés chez la levure et les plantes, on a récemment découvert un rôle très important de ces micro ARN : ils peuvent inhiber l'expression des gènes dans certains types cellulaires d'une manière durable en agissant sur la configuration de l'ADN dans le noyau. Par ce mécanisme dit **épigénétique**, car il n'implique pas de modification du code génétique, tout en montrant une très grande permanence, ces ARN interviennent d'une manière jusque-là insoupçonnée dans la différenciation cellulaire. En effet, la molécule d'ADN peut se trouver dans le noyau cellulaire, sous deux états distincts : ou bien il est déroulé et accessible à la transcription en ARN messager ou bien il est enroulé sur lui-même

et étroitement associé à des protéines ce qui a pour résultat l'inactivation des gènes qu'il contient. Ce verrouillage des gènes, qui est à la base des mécanismes de la différenciation cellulaire, est transmis de cellule à cellule lors de la division cellulaire.

x

x x

Il est possible de synthétiser les petits ARN interférents capables de réduire au silence d'une manière spécifique des gènes choisis par l'expérimentateur. On peut alors s'en servir pour contrôler d'une manière simple et efficace l'expression génique non seulement chez les plantes, le ver ou la drosophile, mais aussi maintenant dans les cellules des mammifères cultivées *in vitro*, voire même dans l'animal.

Cette avancée technologique a immédiatement entraîné une explosion de recherches qui apportent jour après jour des informations très importantes dans les domaines de la génomique fonctionnelle et de la médecine.

En effet le potentiel thérapeutique des petits ARN interférents est devenu un champ de recherches dont l'importance s'accroît à une vitesse stupéfiante.

Les premières expériences d'inactivation d'un gène chez la souris par l'injection d'ARN interférent datent de 2002. La possibilité d'éviter la survenue d'une hépatite fulminante comme celles qui sont provoquées chez l'Homme par la mort massive des cellules hépatiques à la suite d'une infection virale par exemple a été démontrée chez la souris en 2003. La méthode utilisée a consisté à traiter l'animal par des ARN interférents spécifiques des gènes codant pour des protéines (le récepteur *Fas* et *Caspase 8*) dont on sait qu'elles sont à l'origine de la mort par apoptose, des cellules hépatiques.

Certains problèmes se posent pour l'application de cette thérapeutique chez l'Homme ; en particulier celui de l'administration sélective de ces petites molécules aux tissus malades. De nombreux laboratoires travaillent à améliorer la technique de ciblage de ces "médicaments" potentiels.

Une autre limitation vient de ce que, contrairement aux plantes et aux animaux inférieurs comme le ver *Caenorhabditis elegans*, les mammifères ne possèdent pas la machinerie biochimique qui permet l'amplification des ARN interférents. Leur durée d'action dans la cellule, lorsqu'ils y ont eu accès, est limitée à quelques jours. Des méthodes sont en cours de développement pour circonvenir cet obstacle. Elles font en particulier intervenir des virus modifiés, rendus capables de produire l'ARN interférent correspondant à un gène donné. Une manipulation de ce type a permis d'inactiver un carcinogène humain responsable du cancer du pancréas dans un système qui pour l'instant reste expérimental mais qui permet de prévoir une application thérapeutique future à l'Homme.

D'autres applications sont en vue et font l'objet de recherches intensives dans le but de combattre les infections virales notamment par le VIH, le cancer et certaines maladies neurodégénératives.

Dans ce dernier cas, les applications les plus prometteuses concernent les maladies oculaires telles que la "dégénérescence maculaire liée à l'âge" (DMA) qui provient d'une croissance anormale des vaisseaux sanguins de la rétine entraînant la mort neuronale et la cécité.

Des ARN interférents dirigés contre les molécules responsables de la croissance vasculaire peuvent être appliqués dans la région même de la lésion.

Dans la lutte contre le cancer, on vise des gènes qui contrôlent la prolifération ou la mort cellulaire. Ainsi des gènes, comme *Bcl2*, qui sont connus pour inhiber la mort cellulaire sont-ils une cible privilégiée pour tenter d'enrayer la progression tumorale.

Ces technologies basées sur l'ARN interférent ont progressé à un tel rythme, qu'aux États-Unis, la FDA a déjà donné son accord pour que certains essais thérapeutiques soient entrepris chez l'Homme.

C'est le cas pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge pour laquelle deux compagnies pharmaceutiques ont préparé un ARN interférent capables d'inhiber la progression vasculaire dans la rétine.

X

X X

Ainsi, les recherches réalisées au cours de ces dernières années ont révolutionné la conception que l'on avait de la régulation du fonctionnement des gènes.

Il est remarquable de constater que cette révolution a commencé il y a moins de dix ans par la simple observation qu'un ARNm peut réduire au silence le gène qui l'a produit. Le mécanisme qui en est responsable, repose sur l'existence d'un système de protéines enzymatiques capables de se lier à des ANR double brin qui deviennent alors des instruments de destruction puissants pour les produits des gènes qu'ils reconnaissent. Cette stratégie moléculaire est à l'œuvre depuis l'apparition des plantes et des animaux sur la planète, mais absent chez les Procaryotes qui les ont précédés. Il est permis de penser que son **importance dans l'évolution des Eucaryotes a été considérable**. Ce nouvel acte dans la grande aventure scientifique de la génétique moléculaire dont les débuts remontent aux années cinquante, a commencé bien humblement par une suite d'observations fortuites sur des pétunias puis sur un petit ver . leur signification n'a cependant pas échappé aux chercheurs, puisqu'elle a déclenché une explosion de travaux qui, dépassant le cadre des laboratoires de biologie fondamentale, constituent désormais un axe majeur de recherches pharmaceutiques.