

Université de Sherbrooke

Validation des *Dicer-substrate siRNA* au niveau du système nerveux central dans le
contexte de la recherche sur la douleur

Par

Louis Doré-Savard

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de
l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie

Le vendredi 15 août 2008

Évalué par

Philippe Sarret, Ph.D. Physiologie et biophysique

Éric Rousseau, Ph.D. Physiologie et biophysique

Luc Paquet, Ph.D. Pharmacologie, Université de Sherbrooke



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-53388-8
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-53388-8

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

LISTE DES TABLEAUX ET ILLUSTRATIONS.....	II
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	IV
RÉSUMÉ.....	1
INTRODUCTION.....	4
1. Interférence par l'ARN.....	4
1.1 Études <i>in vitro</i>	7
1.2 Études <i>in vivo</i>	8
1.3 Méthodes d'administration <i>in vivo</i>	10
1.3.1 Injection systémique ou directe	10
1.3.2 Administration dans le système nerveux central.....	13
1.3.3 Limites de la technique.....	14
1.3.3.1 Stimulation du système immunitaire.....	14
1.3.3.2 Effets « hors cible »	18
1.4 Dicer substrate siRNA	20
1.5 Outils de transport et de distribution.....	27
1.5.1 Lipoplexes cationiques.....	28
1.5.2 Polymères cationiques.....	33
1.5.3 Vecteurs viraux	34
2. La Douleur	36
2.2 Nociception	37
2.2.1 Nocicepteurs et afférences primaires	37
2.2.2 Les récepteurs de la nociception	40
2.2.3 La moelle épinière	42
2.2.3.1 Voies ascendantes	42
2.2.3.2 Voies descendantes	43
2.3 Traitement de la douleur.....	45
3. Neurotensine	47
3.1 Distribution dans le système nerveux central	48
3.1.1 Cerveau	48
3.1.2 Moelle épinière	49
3.2 Récepteurs à la neurotensine	50
3.2.1 NTS1.....	51
3.2.2 NTS2.....	52
3.3 La neurotensine et l'analgésie	54
BUT ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	57
ARTICLE	58
DISCUSSION.....	95
1. Validation des duplex <i>In vitro</i>	97
2. Les DsiRNA, plus efficaces à faible dose que les siRNA conventionnels?.....	100
3. Quantification de l'expression du gène NTS2.....	102
4. Validation comportementale.....	103
5. Contrôles	107
7. Perspectives.....	114
8. Conclusion.....	116
RÉFÉRENCES	124

LISTE DES TABLEAUX ET ILLUSTRATIONS

Tableau 1. Inventaires des études cliniques effectuées et en cours utilisant la technologie des siRNA.....	12
Tableau 2. Liste exhaustive des études publiées utilisant des siRNA <i>in vivo</i> dans le cadre de recherches sur la douleur.....	14
Figure 1. Assemblage des siRNA dans le RISC chez <i>Drosophila Melanogaster</i>	6
Figure 2. Activation du système immunitaire par les siRNA.....	16
Figure 3. Les ARNs double-brins de 27 nt sont des interférents plus efficaces que les siRNA standards.....	21
Figure 4. Mécanisme d'action des DsiRNA.....	22
Figure 5. Analyse en spectrométrie de masse des produits de clivage par Dicer.....	24
Figure 6. Les trois principales conformations possibles des complexes lipides cationiques-acides nucléiques.....	27
Figure 7. Prise en charge cellulaire d'un complexe de lipides cationiques par endocytose.....	29
Figure 8. Représentation schématique des composantes structurales d'un complexe cationique pour le transport de siRNA <i>in vivo</i>	31
Figure 9. Récepteurs se trouvant à la surface des nocicepteurs.....	37
Figure 10. Les différentes fibres afférentes primaires.....	37
Figure 11. Différents médiateurs inflammatoires relâchés par un tissu lors d'une blessure.....	40
Figure 12. Les principales voies ascendantes et descendantes.....	41
Figure 13. Inhibition de la nociception au niveau spinal.....	43
Figure 14. Échelle de traitement de la douleur de l'Organisation mondiale de la santé...	46
Figure 15. Séquence peptidique de la neurotensine.....	47

Figure 16. Localisation de la neurotensine dans le cerveau du rat.....	48
Figure 17. Localisation de la neurotensine dans la moelle épinière du rat.....	49
Annexe 1-5. Résultats complémentaires.....	119

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

5-HT : Sérotonine

AAV : « Adeno-associated virus »

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ago2 : Argonaut 2

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

AMPc : Adénosine mono-phosphate cyclique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine tri-phosphate

CHO : « Chinese Hamster Ovary »

COX : Cyclooxygénase

Dcr2 : Dicer 2

DOTAP : N-[1-(2,2-dioleoyloxy)]-N,N,N triméthyle ammonium propane

DOTMA : N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride

DRG : “Dorsal root ganglion”

DsiRNA : “Dicer substrate siRNA”

EGFP: “Enhanced GFP”

G/C: Guanine/cytosine

GFP: « Green fluorescent protein »

IDT: Integrated DNA Technologies Inc.

IFN: Interferon

IL: Interleukine

IP3: Inositol triphosphate

JMV-431: antagoniste sélectif pour le récepteur NTS2

MAP : “Mitogen activated protein”

NFκB : “Nuclear factor kappa B”

NK: “Natural killer”

nt: nucleotide

NT: Neurotensine
NTS1: Neurotensine site 1
NTS2 : Neurotensine site 2
OMS : Organisation mondiale de la santé
PAZ : Piwi Argonaut Zwillie
PD149163 : Agoniste sélectif pour le récepteur NTS1
Poly IC : Acide polyinosinique-polycytidylique
RISC: "RNA-induced silencing complex"
shRNA: "Short-hairpined RNA"
siRNA: "small interfering RNA"
SNC: Système nerveux central
TLR: "Toll-like receptor"
TNF α : "Tumor necrosis factor alpha"
TrkA: "Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1"
UTR: "Untranslated region"
VEGF: "Vascular Epidermal Growth Factor"
VR-1: "Vanilloid receptor 1"
VRL-1: "Vanilloid receptor-like protein"

RÉSUMÉ

L'interférence par l'ARN a récemment gagné beaucoup en respect et en popularité. En effet, le nombre d'études précliniques utilisant des petits ARN interférents (siRNA) pour élucider la fonction d'un gène ne cesse de s'accroître et est encore appelé à augmenter. Ces siRNA représentent en effet un outil pour déchiffrer le transcriptome humain. Ils consistent en une toute nouvelle classe de composés ayant un potentiel thérapeutique qui pourraient intervenir dans plusieurs pathologies où l'invalidation d'une protéine cible est le but visé. Ainsi, en plus des modèles expérimentaux *in vitro et in vivo*, le transfert vers des études cliniques est déjà commencé et certains composés sont maintenant en phase III. Par contre, plusieurs effets secondaires viennent faire de l'ombre sur le potentiel clinique des siRNA, notamment l'immunostimulation, la stabilité limitée dans le sérum, leurs faible pénétration dans la cellule, l'inflammation et le manque de spécificité causés par les doses importantes devant être administrées et l'impossibilité de cibler un type cellulaire en particulier. De plus, l'acheminement de ces composés au système nerveux central est un aspect délicat puisque les siRNA ne passent pas la barrière hémato-encéphalique. C'est pourquoi, en parallèle avec les études cliniques en cours, des expérimentations sont menées afin de développer de meilleurs composés d'interférence et des méthodes d'acheminement plus spécifiques et plus efficaces. C'est dans cette optique que les *Dicer substrate* siRNA (DsiRNA) ont été élaborés.

Les DsiRNA sont des ARN double-brins de 27 nucléotides capables d'interférence et ce, à plus faible dose que les siRNA conventionnels *in vitro* (KIM et al. , 2005). Au cours de la présente étude, nous avons démontré que l'utilisation des DsiRNA à très faible dose dans le système nerveux central était possible. En effet, nous avons administré 2 doses de 1µg par animal (250g) de DsiRNA formulées à un transfectant de type lipide cationique par voie intrathécale au niveau lombaire chez le rat. Après avoir validé leur degré de pénétration dans les neurones de la moelle épinière et des ganglions de la racine dorsale, nous avons observé que les DsiRNA visant le récepteur NTS2 de la neurotensine ont diminué de façon significative la quantité d'ARNm codant pour la protéine NTS2. La présence de la protéine était aussi diminuée suite à l'administration des DsiRNA. Finalement, nous avons procédé à des tests comportementaux afin d'examiner les conséquences de l'inhibition de l'expression du récepteur NTS2 sur les effets analgésiques de son agoniste spécifique, le JMV-431. Cet agoniste est documenté comme ayant un effet analgésique au niveau spinal mesuré par une augmentation de la latence au test du retrait de la queue. Cet effet a bien été observé chez les rats ayant reçu un DsiRNA contrôle alors que l'analgésie induite par le JMV-431 administré par voie intrathécale a été complètement abolie chez les animaux traités aux DsiRNA NTS2. Ces résultats comportementaux sont bien le résultat de l'inhibition spécifique de NTS2 puisqu'aucun effet n'a été observé sur la fonction du récepteur NTS1, proche d'un point de vue homologie de séquence. De plus, nos résultats préliminaires indiquent qu'aucun effet d'immunostimulation n'a été déclenché chez les animaux. Cette étude confirme donc le potentiel thérapeutique des DsiRNA au niveau du système nerveux central puisqu'ils sont en mesure d'inhiber une protéine cible à très faible dose sans provoquer

d'effet indésirable dans un modèle de douleur aiguë. Dans l'avenir, nous allons évaluer leur potentiel dans un modèle de douleur chronique qui servira de ligne directrice pour l'inhibition de cibles touchant d'autres pathologies du système nerveux central telles que l'encéphalite virale, le cancer ou encore des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

INTRODUCTION

1. Interférence par l'ARN

L'interférence par l'ARN est un phénomène très conservé chez les êtres vivants, que ce soit chez les invertébrés primitifs, les champignons, les plantes, les insectes et même les mammifères. Ce mécanisme de protection de la cellule viserait à défendre celle-ci contre les affections de type génomique tels que les virus et les transposons. Cette interférence jouerait aussi un rôle de régulateur post-transcriptionnel de l'expression des gènes lors du développement (AGRAWAL et al. , 2003). Il est alors possible pour la cellule d'inhiber l'expression d'une protéine lorsque sa présence n'est pas requise malgré la transcription de son gène. Il est connu depuis plusieurs années qu'il est possible d'inhiber l'expression d'une protéine à l'intérieur d'une cellule ou d'un organisme à l'aide de segments d'ARN double-brin (IZANT et WEINTRAUB,H. , 1984). Ce sont Andrew C. Fire et Craig C. Mello qui ont pour la première fois réalisé ce genre d'expérience sur le nématode *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al. , 1998). Ces derniers ont d'ailleurs démontré que l'utilisation d'ARN double brin était plus efficace que chacun des deux brins administrés séparément. Par contre, il n'était pas clair à ce moment que la longueur optimale n'était que de 21 ou 22 nt. Ce n'est qu'à la suite d'études sur la drosophile qu'il a été montré que des séquences aussi petites pouvaient induire l'inhibition de l'expression d'un gène (ZAMORE et al. , 2000). À partir de ce moment, de nombreuses études ont été menées afin de percer le secret de ces siRNAs et d'en évaluer le potentiel pour inhiber l'expression de gènes *in vitro* et *in vivo*.

Les mécanismes régissant la reconnaissance et le clivage des ARNs indésirables sont maintenant connus et les protéines qui agissent dans ce processus sont sensiblement les mêmes d'un organe et d'un organisme à l'autre. La **figure 1** montre comment les longues séquences d'ARN double-brin sont reconnues par le complexe enzymatique Dicer, un hétérodimère composé des protéines Dicer2 (Dcr2) et R2D2, qui lie spécifiquement les ARNs double-brin (BERNSTEIN et al. , 2001). Par la suite, ce long ARN est clivé en plus petits fragments de 21 ou 22 nucléotides (nt). Ces fragments constituent la molécule capable d'initier l'interférence, on les appelle d'ailleurs *small interfering RNA* (siRNA). Ces derniers sont d'abord intégrés dans le complexe enzymatique *RNA-induced silencing complex* (RISC). Il est à noter que Dicer2 est lui-même une des composantes de RISC; elle s'associe avec les fragments de 21-22 nt pour les escorter dans RISC. Les siRNAs peuvent rester couplés à Dicer suite au clivage ou encore être libérés et rencontrer un nouveau complexe Dicer au moment d'intégrer RISC. La formation de RISC est endothermique et requiert une molécule d'ATP. Sa principale fonction réside dans son activité hélicase. En effet, c'est à l'aide de la protéine Ago2 qui déplie l'ARN que RISC, plus précisément Dcr2 qui possède l'activité hélicase, se débarrasse d'un des deux brins (le brin dit « passager ») (SONTHEIMER. , 2005). Le second brin (le brin « guide »), en s'associant au domaine PAZ de cette protéine Ago2, devient prêt à recevoir l'ARN messenger cible dont une partie de la séquence lui est complémentaire.

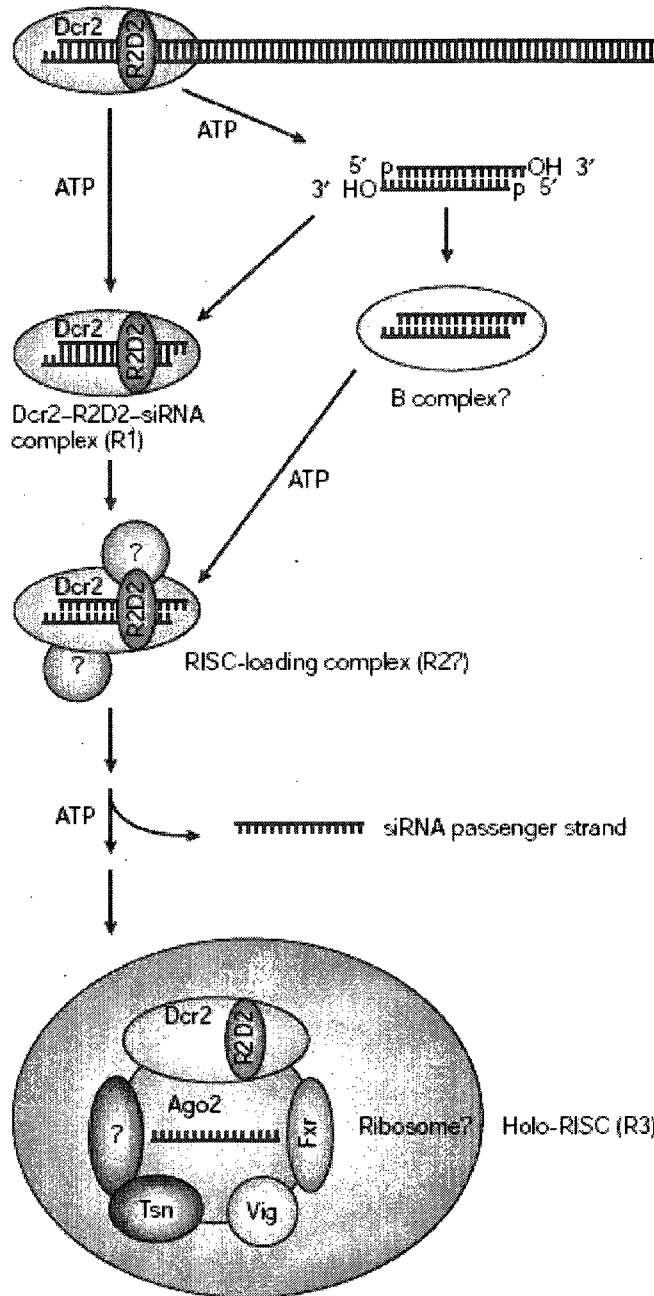


Figure 1. Assemblage des siRNA dans le RISC chez *Drosophila Melanogaster*. (Sontheimer 2005). Le long ARN double-brin est reconnu par Dicer puis clivé en siRNA de 21nt (complexe R1). D'autres sous-unités viennent s'ajouter (complexe R2) et le brin passager est éliminé. Le brin guide s'intègre à la protéine Ago 2 et il y a formation du complexe RISC (complexe R3).

La sélection du brin guide sur la séquence double brin ne se produit pas au hasard. En effet, c'est la stabilité des appariements entre les bases qui fait en sorte que le

déroulement et la séparation des brins sont initiés dans un sens ou dans l'autre. Par conséquent, si une extrémité est la moins stable, à faible contenu en G/C, c'est le brin dont l'extrémité 5' est située à cette extrémité qui sera sélectionné en tant que brin guide (REYNOLDS et al. , 2004). Lorsque le brin guide et la molécule d'ARN messenger cible sont appariés, c'est la fonction d'endonucléase de RISC qui se charge du clivage. L'unité ou le domaine de RISC responsable de cette réaction reste à déterminer mais il est déjà montré que Dicer et d'autres sous-unités de RISC possèdent cette activité d'endonucléase (SONTHEIMER. , 2005). Finalement, l'ARNm clivé est dégradé par des exoribonucléases indépendantes de RISC (PHAM et SONTHEIMER,E. J. , 2004).

1.1 Études *in vitro*

Depuis la parution de l'étude de Fire et Mello en 1998, près de 18 000 études portant sur les siRNA ont été publiées. Certaines plus marquantes ont orienté les autres. L'étude d'avant-garde d'Elbashir et collègues a montré l'efficacité des duplex de 21 nt dans des cellules de mammifères en donnant les premiers indices du potentiel que cette méthode pourrait avoir dans l'étude de la fonction des gènes, en particulier chez l'homme (ELBASHIR et al. , 2001a). Par la suite, les siRNA ont été efficacement administrés à une grande variété de types cellulaires pour finalement être introduits dans des cultures primaires de neurones embryonnaires de rat (KRICHEVSKY et KOSIK,K. S. , 2002). À ce jour, les recherches se poursuivent sur des cellules en culture afin d'élucider la fonction des gènes, en particulier sur des cellules d'origine humaine dont l'étude est

impossible *in vivo*. Les études sur les cellules cancéreuses, la bataille contre certains virus comme l'influenza et le virus d'immunodéficience humaine (MA et al. , 2007) ainsi que la validation de méthodes d'acheminement doivent se poursuivre avant le transfert vers des sujets humains (AIGNER. , 2006, AKHTAR et BENTER,I. F. , 2007).

Les études *in vitro* ont aussi récemment évolué au point où les siRNA sont devenus un puissant outil dans le déchiffrement du génome humain et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, la mise au point de larges banques de siRNA permet de soumettre les cellules à l'inhibition d'une grande quantité de gènes. Les cellules sont soumises aux différents siRNA un (un à la fois) et les effets sur la voie de signalisation d'intérêt sont ensuite examinés à l'aide d'un marqueur d'activité. On peut donc identifier les molécules qui, lorsqu'elles sont inhibées, entraînent un changement dans l'expression de ce marqueur. Des molécules pharmacologiques (siRNA, peptides modifiés, composés chimiques de synthèse ou autres) seront ensuite élaborées en fonction de ces observations et des cibles identifiées. Cette rapide progression depuis 1998 a mené aux premières études *in vivo*.

1.2 Études *in vivo*

Les études *in vitro* sont importantes pour la compréhension des mécanismes d'actions et des acteurs impliqués dans le processus d'interférence par l'ARN. De plus, elles sont le précurseur des expériences précliniques assurant le transfert des modèles cellulaires vers

les études animales et humaines. Les principaux modèles d'étude utilisés à cette fin sont d'abord *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al. , 1998) et *Drosophila melanogaster* (ELBASHIR et al. , 2001b). Ces organismes modèles sont avantageux du point de vue de leur relative simplicité. Il est facile d'observer un changement dans le développement de ces invertébrés suite à l'inhibition de l'expression d'un gène étant donné leur nombre limité de cellules. Par contre, l'engouement pour cette technique en termes de potentiel thérapeutique a vite provoqué le transfert de cette technologie à des modèles beaucoup plus évolués. Ainsi, des duplex ont été synthétisés dans le but d'inhiber des gènes chez la souris, le rat, le cobaye et le singe, liés à une grande variété de pathologies touchant différents organes (AKHTAR et BENTER, I. F. , 2007, BEHLKE. , 2006).

De façon plus spécifique, plusieurs études ont montré qu'il était possible d'administrer des siRNA à des rongeurs au niveau du système nerveux central. La première fut réalisée chez la souris dans le but d'inhiber l'expression de l'*Agouti-related protein* dans l'hypothalamus et d'en observer les effets sur les fonctions métaboliques (MAKIMURA et al. , 2002). La micro-injection de 0,5µl de siRNA (1mM) de façon bilatérale a entraîné une réduction de 50% de l'expression de la protéine. Ce premier résultat d'invalidation fonctionnelle fut confirmé par de nombreuses équipes qui ont utilisé diverses méthodes d'administration (LINGOR et BAHM, M. , 2007).

1.3 Méthodes d'administration *in vivo*

1.3.1 Injection systémique ou directe

Un bon nombre de formulations est disponible afin d'administrer des ARN interférants à des animaux d'expérimentation, que ce soit en administration locale ou systémique. Au niveau systémique, les tentatives d'utilisation de siRNA nus sont limités en raison de leur vulnérabilité aux enzymes de dégradation contenues dans le sang ou le sérum (FILLEUR et al. , 2003). Par conséquent, les doses élevées requises pour avoir un effet augmentent les risques d'effets indésirables (voir section 1.3.3). De plus, la technique la plus utilisée pour l'administration intra-veineuse, soit la transfection hydrodynamique par la veine caudale, est difficilement transposable chez l'humain. En effet, ces protocoles visant le foie requièrent l'injection de 1ml de solution saline chez la souris (GILADI et al. , 2003, ZENDER et al. , 2003). Cela correspond à un volume de 3 litres chez l'humain. L'injection d'un tel volume à un humain n'est pas envisageable car elle causerait des problèmes d'hypervolémie sévère et entraînerait un œdème pulmonaire ou une crise cardiaque. L'administration de siRNA anti-TNF α à l'aide de cette méthode a permis à des souris de survivre à l'injection d'une forte dose de lipopolysaccharide (SORENSEN et al. , 2003). Plus récemment, des études cliniques poursuivies par la compagnie ISIS ont permis d'inhiber l'expression de la protéine ApoB100 dans le foie avec des quantités de 100 à 400mg chez l'humain. Ces siRNA sont injectées en sous-cutané sans pour autant que la chimie utilisée ne soit décrite. Finalement, la méthode d'administration qui a rencontré le meilleur succès jusqu'à maintenant se fait par voie intraoculaire. En effet,

l'injection directe de siRNA anti-VEGF dans l'humeur vitrée de l'œil permet d'inhiber la néovascularisation de la cornée (REICH et al. , 2003). Cette approche a d'ailleurs été portée en essais cliniques pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et les progrès sont appréciables. Un de ces composés est maintenant approuvé pour des études cliniques par la *Food and Drugs Administration*, ce qui montre bien l'applicabilité clinique potentielle de cette technologie (BEHLKE. , 2006, WHELAN. , 2005). Le cancer est un autre secteur visé par le développement des siRNA par la communauté scientifique. Plusieurs études ont montré que les siRNA classiques peuvent être injectés directement au niveau d'une tumeur sous-cutanée ou par voie systémique et ainsi inhiber des molécules de surface responsables de l'adhésion (CEACAM-6) ou de la croissance (CSF-1) de la tumeur et en freiner la prolifération (DUXBURY et al. , 2004)(et plusieurs autres)(AHARINEJAD et al. , 2004)

#NCT	Pathologie ciblée	Voie d'administration	Niveau-statut	Investigateur
NCT00716014	Pachyinchia Congenita	Injection localisée	Phase I-En cours	PC Project
NCT00363714	DMLA et VC	Intra-vitréale	Phase I-II-Complétée	Sirna Therapeutics
NCT00395057	DMLA et VC	Intra-vitréale	Phase II-en cours	Allergan (Sirna) Therapeutics
NCT00672542	Mélanome métastatique	Réinjection cellules dendritiques transfectées	Phase I-Recrutement	Duke University
NCT00257647	Leucémie myéloïde chronique	Intra-veineuse (virus SV40)	Phase I-Complétée	Hassadah Medical Organization
NCT00689065	Tumeur solide cancéreuse	Intra-veineuse (polymères)	Phase I-Recrutement	Calando Pharmaceuticals
NCT00306904	Œdème maculaire diabétique	Intra-vitréale	Phase II-Complétée	Opko Health
NCT00154934	Pré-éclampsie	Ex vivo	Non défini	National Taiwan University Hospital
NCT00557791	DMLA	Intra-vitréale	Phase III-En attente	Opko Health
NCT00554359	Insuffisance rénale post-chirurgicale	Intra-veineuse	Phase I	Quark Pharmaceuticals
NCT00581152	Cellules souches-Différentiation	Ex vivo	En cours	University of California in Irvine
NCT00259753	DMLA	Intra-vitréale	Phase II-Complétée	Opko Health

Tableau 1. Inventaires des études cliniques effectuées et en cours utilisant la technologie des siRNA. DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge, VC : Vascularisation choroïdale. Information tirée de *clinicaltrials.gov*.

À la lumière de ces différents travaux, il est possible de conclure que l'administration de siRNA sans système de transport (lipide cationique ou vecteur viral), tant par voie systémique que directe, est possible. Par contre, le développement d'outils améliorant le transport de siRNA et leur pénétration dans le tissu ou la cellule cible est en train d'assurer la transition entre des expériences du domaine expérimental ou préclinique vers une validation clinique de ces composés comme thérapie pour de nombreuses maladies et affections. Cette problématique sera abordée dans la section 1.5.

1.3.2 Administration dans le système nerveux central

L'acheminement des siRNA jusqu'au système nerveux central pose problème puisque ces composés ne passent pas la barrière hémato-encéphalique en raison de leur caractère hydrophile et de leur taille trop grande. Certaines études rapportent aussi leur faible efficacité lorsqu'ils sont administrés sans assistance directement au niveau du SNC (ISACSON et al. , 2003). Par conséquent, il devient nécessaire d'injecter les siRNA directement dans le SNC, que ce soit localement dans la structure visée ou encore dans le liquide céphalo-rachidien environnant. Les techniques impliquées sont invasives et exigent des procédures chirurgicales complexes, de longues périodes de récupération ou encore la pose de cathéters qui peuvent eux-mêmes modifier la réponse nociceptive de l'animal dans un modèle de douleur (DELEO et al. , 1997). Plusieurs études montrent que le traitement du SNC avec des siRNA nus est possible. Par exemple, l'infusion en continu de siRNA au niveau intrathécale à l'aide d'une mini-pompe osmotique (400 µg/jour) a permis de réduire significativement l'expression du récepteur P2X₃ chez des rats atteints de douleur neuropathique (DORN et al. , 2004). De la même manière, cette fois à l'aide de six injections de 60 µg de siRNA pendant 2 jours, il a été possible de réduire l'expression d'une isoforme du canal calcique de type N afin de réduire la douleur chez des rats neuropathiques ou souffrant de douleur inflammatoire (ALTIER et al. , 2007). On peut voir avec ces expériences que les quantités de siRNA utilisées sont très importantes car des quantités jusqu'à dix fois moins fortes de siRNA nus peuvent causer des effets secondaires (voir section 1.3.3). Cela fait partie des quelques limites qui subsistent en rapport avec la technologie des ARN interférents.

Cible	Quantités utilisées	Voie d'administration-modèle	Référence
Glycine Transporter 1	Vecteur viral	i.t.-souris	(MORITA et al. , 2008a)
Glycine Receptor $\alpha 3$	Vecteur viral	i.t.-souris	(MORITA et al. , 2008b)
Ephrin B2	30 μ g	IntraDRG-rat	(KOBAYASHI et al. , 2007)
N-Type Calcium Channel	60 μ g	i.t.-rat	(ALTIER et al. , 2007)
NMDA Receptor 1	Vecteur viral	i.t.-souris	(GARRAWAY et al. , 2007)
TRPV1	5 μ g	i.t.-rat	(KASAMA et al. , 2007)
NMDA Receptor 2B	Vecteur viral	i.t.-souris	(GABRA et al. , 2007)
Na _v 1.8 TTXR Channel	20 μ g	i.t.-rat	(DONG et al. , 2007)
Vasopressin Receptors	1-2 μ g	Micro-injection PAG-rat	(YANG et al. , 2007)
TRPV1	1 ng	i.t.-rat	(CHRISTOPH et al. , 2006)
Prostaglandin Receptor EP4	200 μ g	i.t.-rat	(LIN et al. , 2006)
Purinergic Receptor P2X ₃	400 μ g	i.t.-rat	(DORN et al. , 2004)
NMDA Receptor 2B	5 μ g	i.t.-rat	(TAN et al. , 2005)
Delta Opioid Receptor	2 μ g	i.t.-rat	(LUO et al. , 2005)

Tableau 2. Liste exhaustive des études publiées utilisant des siRNA *in vivo* dans le cadre de recherches sur la douleur. i.t. : intrathécale, PAG : substance grise périaqueducule, NMDA : N-méthyle-D-aspartate : TRPV : Transient receptor potential vanilloïd, TTXR : tetrodotoxine résistant.

1.3.3 Limites de la technique

Les techniques utilisant des ARN interférents gagnent rapidement en popularité. Cependant, l'accélération du transfert vers les études cliniques et l'évaluation du potentiel thérapeutique de ces composés dans le traitement d'un plus grand nombre de pathologie est freiné par plusieurs limites. Outre les considérations économiques et les problèmes de stabilité et de transport (voir section 1.5), la stimulation immunitaire et les effets hors-cibles devront être contournées.

1.3.3.1 Stimulation du système immunitaire

La plus grande limitation des siRNA consiste en l'activation du système immunitaire inné des cellules (MARQUES et WILLIAMS, B. R. , 2005). Les siRNA sont reconnus par différents récepteurs présents à la surface des endosomes des cellules de mammifère tels

que TLR3, TLR7 et TLR8. La liaison de ces récepteurs à leur ligand (des ARNs double-brin ou simple-brin) conduit à l'activation du système de l'interféron et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. La **figure 2** montre de façon schématique comment les siRNA sont intégrés dans les endosomes pour ensuite être reconnus, de façon séquence-dépendante, par l'un ou l'autre des récepteurs *toll-like* impliqués. Il s'en suit l'activation de voies de signalisation impliquant la MAP kinase p38, l'*interferon regulatory factor 7* ou encore NFκB qui induiront la production de différentes cytokines et de l'interféron. Étant donné le caractère séquence-dépendant de l'activation de la réponse immunitaire induite par les siRNA, il est peu probable que TLR3 soit impliqué, puisque son activation est séquence indépendante (KIM et al. , 2007).

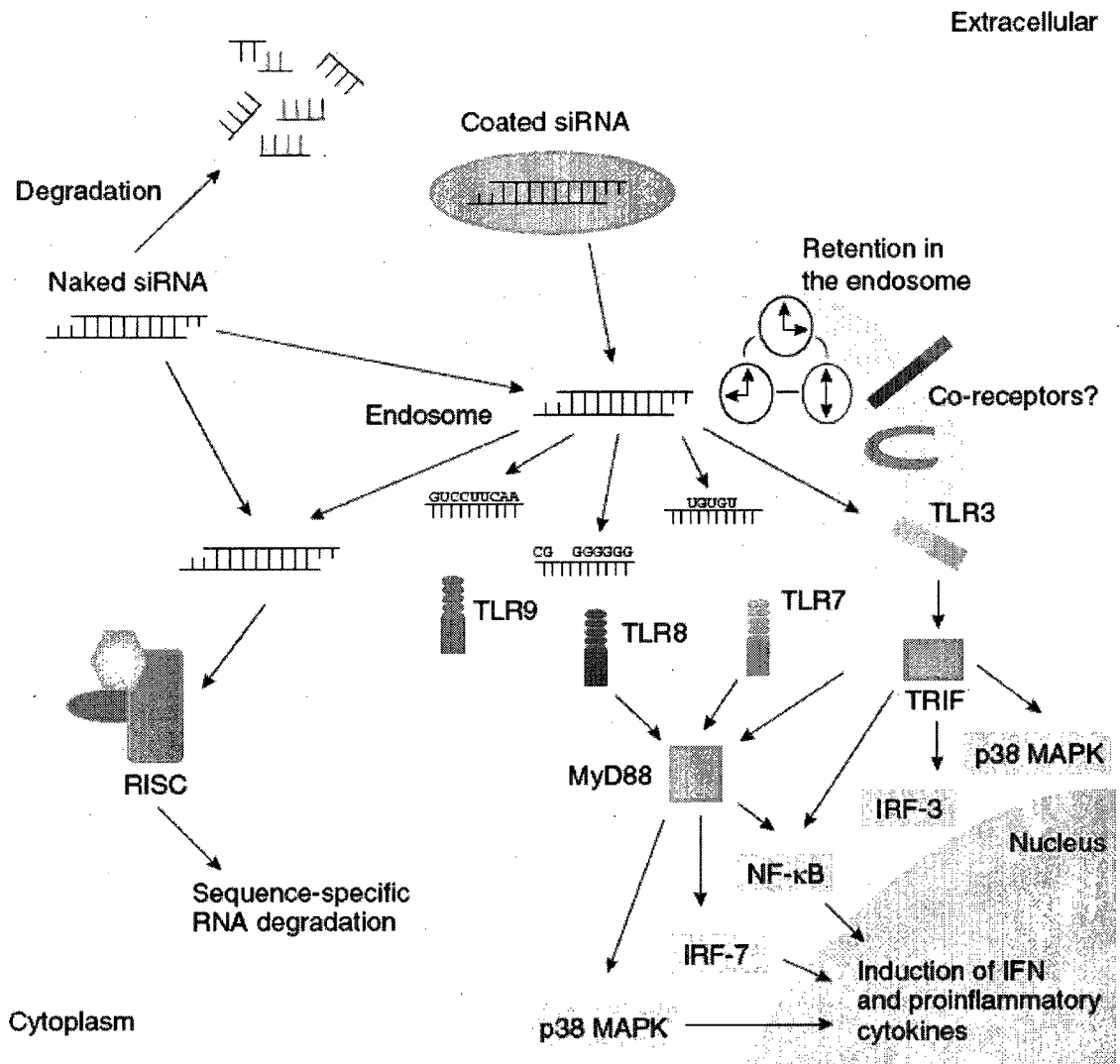


Figure 2. Activation du système immunitaire par les siRNA (Marques 2005). Les siRNA, qu'ils soient protégés ou non par un système de transport, intègrent les endosomes. Ils peuvent alors être reconnus par les récepteurs *toll-like* qui s'y trouvent. Ceux-ci déclenchent la transcription de gènes pro-inflammatoires et de l'interféron.

Il y a donc plusieurs facteurs à considérer si l'on veut éviter l'activation du système immunitaire *in vivo*. D'abord, comme mentionné plus haut, certaines séquences nucléotidiques ont tendance à être plus immunostimulatrices que d'autres. Par exemple, les séquences riches en uracile et en guanine (UGUGU, GUCCUCAA) sont facilement reconnues par TLR7 et TLR8 (HORNUNG et al. , 2005, JUDGE et al. , 2005). Il est aussi important de mentionner que l'ARN simple brin lie plus facilement ces récepteurs.

Ce sont donc les brins simples qui auraient le potentiel d'initier la réponse immunitaire (SIOUD. , 2005). La taille du duplex a aussi une grande influence sur la force de la réponse. En effet, Hornung et ses collègues ont montré que les séquences très courtes de 12 nt ne parvenaient pas à induire l'interféron alors qu'on observait un retour de cet effet avec des molécules de 19 nt (HORNUNG et al. , 2005). De la même manière, une étude plus ancienne a montré que cette réponse était aussi provoquée par des ARN plus longs, allant de 30 à 60 nt (MANCHE et al. , 1992). Finalement, la structure des duplex peut influencer la propension de ce dernier à initier une réponse immunitaire. En effet, un certain intérêt a été porté sur les modifications structurales des siRNA afin d'enrayer la réponse immune. Par exemple, les acides nucléiques verrouillés (*Locked nucleic acids*) (BRAASCH et al. , 2003) comportant un lien supplémentaire entre les carbones 2' et 4' ont permis d'éliminer l'activité immunostimulatrice. Cependant, l'activité d'interférence s'en trouve aussi modifiée dans certains cas (GRUNWELLER et al. , 2003). Des modifications en 2' des nucléotides permettent aussi de bloquer l'induction des cytokines inflammatoire telles que l'IL-6. L'ajout d'un groupement fluor, O-méthyle ou hydrogène permet ainsi, d'éviter la production de cytokines tout en conservant l'activité d'interférence (JUDGE et al. , 2006, ROBBINS et al. , 2007) et pourrait même prévenir l'activation de TLR7 (ROBBINS et al. , 2007).

1.3.3.2 Effets « hors cible »

Malgré la grande spécificité que devrait leur conférer la longueur et la nature de leur séquence, les siRNA peuvent interagir avec des ARN messagers non visés via des appariements partiels. Cela aura pour conséquence d'induire des changements dans l'expression d'autres gènes que celui ciblé (ALEMAN et al. , 2007). C'est ce qu'on appelle un effet hors cible (*off-target*). Cet appariement partiel semble requérir les nucléotides 9 à 11 et peut se produire autant dans la région traduite que dans la région non-traduite en 3' (3' UTR) du messenger (JACKSON et al. , 2006). Ce phénomène est amplifié en présence de concentrations élevées de siRNA.

Plusieurs stratégies ont été développées pour s'assurer que les changements de phénotype sont spécifiques aux *knockdowns* fonctionnels induits par les siRNA. D'abord, il est généralement requis d'utiliser deux siRNA différents dessinés pour le même gène, ce qui permet de confirmer que le changement de phénotype observé est bel et bien dû à la modification de l'expression du gène cible. Il est aussi important d'utiliser plusieurs contrôles négatifs de duplex (ne s'appariant à aucun ARN non-interférant) différents pour éliminer tout effet séquence-indépendant. De plus, un contrôle positif s'appariant parfaitement à un gène sans intérêt pour le phénotype permet d'évaluer *in vitro* et *in vivo* l'efficacité de la transfection. Les contrôles les plus fréquents visent la protéine fluorescente dans le vert GFP et la luciférase, mais ils comportent aussi leurs problèmes de spécificité (TSCHUCH et al. , 2008). Finalement, il est possible de créer un ARN messenger modifié résistant à l'appariement au siRNA (KITTLER et al. , 2005). Les

cellules sont transfectées avec un chromosome artificiel bactérien qui contient la séquence complète du gène ainsi que son promoteur naturel, ce qui permet d'obtenir une expression proche du niveau physiologique. La différence entre l'ARNm produit par ce gène artificiel et celui endogène réside dans une ou plusieurs mutations silencieuses empêchant l'appariement du siRNA sans altérer la structure de la protéine. Ainsi, lorsque l'on réalise les deux expériences d'interférence en parallèle, sur les cellules résistantes et de type sauvage, on devrait observer des changements phénotypiques différents dans ces deux lignées. Cela permet de confirmer hors de tout doute que le changement de phénotype observé est provoqué par l'interférence spécifique. Cette dernière stratégie est plus fastidieuse et difficile à appliquer à des organismes complexes tels les rongeurs (ou même les invertébrés) mais représente sans doute le contrôle le plus convaincant (CULLEN et ARNDT, G. M. , 2005, ECHEVERRI et al. , 2006, SAROV et STEWART, A. F. , 2005). Ce contrôle est valable lorsqu'il s'agit d'études *in vitro* mais ne pourra pas être utilisé lors de protocoles cliniques puisqu'il consiste en la modification du système étudié avant le début des expériences.

Malgré ces limites, les techniques d'ARN interférents ont un fort potentiel clinique comme agents thérapeutiques applicables à l'homme. L'utilisation des contrôles appropriés est toutefois essentielle afin de s'assurer que le phénotype observé est bien le résultat de l'inhibition du transcrit visé lorsqu'on effectue des études de validation *in vitro* ou chez l'animal. De plus, la diminution de la dose injectée représenterait la première avancée à réaliser. En effet, c'est le ratio toxicité vs efficacité qui doit être amélioré. C'est pour venir à bout de ces faiblesses que la communauté scientifique

cherche à développer des siRNA plus performants afin de les rendre plus fiable à faible dose et plus spécifiques dans leur action. C'est dans cette optique que les DsiRNA ont été développés.

1.4 Dicer substrate siRNA

Le but ultime d'une expérience d'interférence est d'élucider la fonction d'un gène ou d'une protéine en inhibant totalement l'expression ou encore de bénéficier des effets de son inhibition sur le plan thérapeutique. Cependant, les diverses expériences réalisées récemment *in vitro* avec des siRNA standards provoquent des inhibitions allant de 50 à 84% (HUANG et al. , 2008, LIU et al. , 2008). Par conséquent, différents chercheurs en milieu académique et en compagnies se sont mis à la recherche de composés de type siRNA capables d'induire une inhibition plus profonde, avoisinant un taux de 100%. L'importance de réussir à diminuer les doses administrées afin d'éliminer les effets secondaires indésirables discutés précédemment est capitale.

C'est dans cette optique que l'équipe de Rossi et la compagnie Integrated DNA Technologies (IDT) ont développé des siRNA plus longs que les composés communément utilisés. Il est déjà connu que les ARN double-brins de plus de 30 paires de bases ont la propriété de stimuler la production de l'interféron via l'activation de la protéine kinase DAI (MANCHE et al. , 1992). Cette caractéristique est aussi observée suite à leur liaison à TLR3 (SLEDZ et WILLIAMS, B. R. , 2004). L'équipe d'IDT s'est alors penchée sur la possibilité que les ARN synthétiques de 25 à 30 nt pourraient être

plus efficaces que les siRNA standards de 21 nt (KIM et al. , 2005). Ils ont synthétisés des duplex de longueurs variant entre 21 et 30 nt portant différentes extrémités, à bout franc ou avec extension. Par exemple, des duplex de 27 nt ont été testés; des duplex à bout franc, avec extension de 2 nt en 3' et avec extension en 5', le tout pour un gène rapporteur. **La figure 3** montre les résultats obtenus selon le duplex utilisé en fonction de la concentration. Parmi les candidats testés, seuls les duplex de 27 nt sont en mesure de produire une inhibition complète du gène *EGFP* à une concentration de 200 pM. De plus, ils sont les seuls à produire une inhibition satisfaisante (de l'ordre de 90% et plus) à une concentration de 50 pM. Finalement, l'inhibition est plus importante lorsqu'on utilise des duplex à bout franc qu'avec une extension en 5' ou en 3'. Lorsque l'on recherche la cause de cette activité accrue, on remarque une corrélation importante entre l'efficacité du clivage de ces duplex par l'enzyme Dicer par rapport à des duplex modifiés dont l'activité est diminuée (**figure 3**).

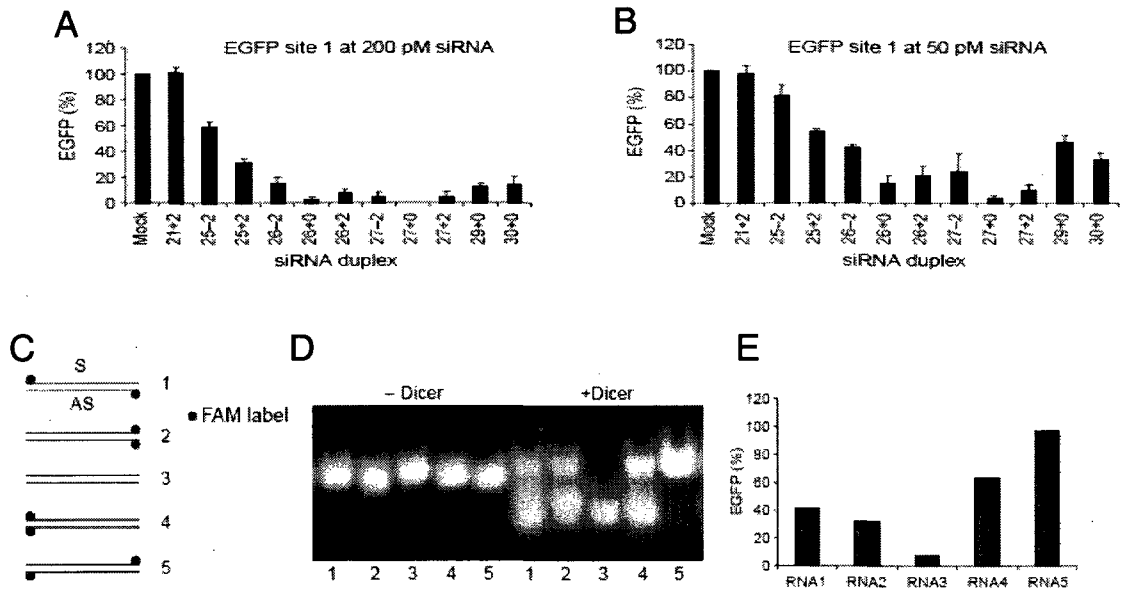


Figure 3. Les ARNs double-brins de 27 nt sont des interférents plus efficaces que les siRNA standards (21 + 2 nt). A) À une concentration de 200 pM, les duplex de 26 et 27 nt sont les plus efficaces dans l'inhibition de EGFP. B) À 50 pM, seuls les duplex de 27nt montrent une grande efficacité. C) Positions des groupements 6-carboxyfluorescine (6FAM) visant à inhiber le clivage par Dicer. D) Les molécules de siRNA modifiées (1,2,4,5) ne sont que partiellement clivées par Dicer contrairement à la molécule sauvage (3). E) Seule la molécule complètement clivée conserve son activité d'inhibition. (Kim DH, 2005).

Il est donc possible de conclure que la principale raison pouvant expliquer cette efficacité accrue serait un clivage plus complet par Dicer. Il a aussi été observé que les 27-mers pouvaient induire l'interférence sur une période de temps plus longue par rapport aux siRNA de 21 nt. Une des hypothèses formulées par les chercheurs de cette équipe est que le fait d'être lié à Dicer et d'être clivé par celui-ci pourrait augmenter l'efficacité de la prise en charge par RISC, d'où une inhibition plus forte. La **Figure 4** illustre ce mode d'action des DsiRNA en passant par Dicer.

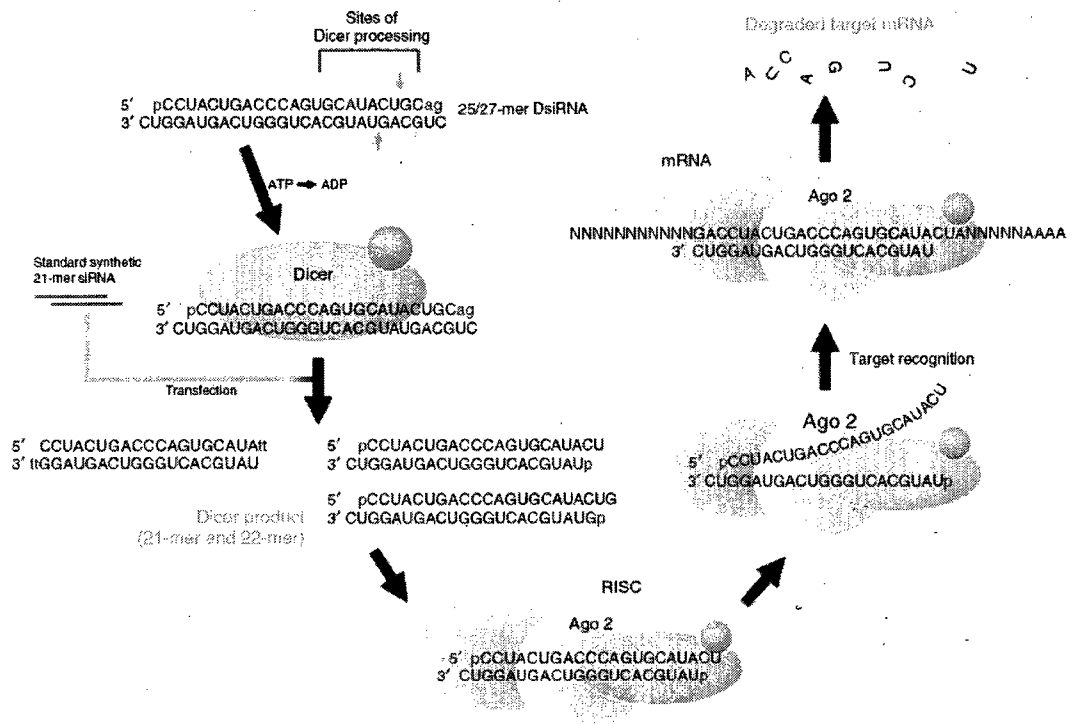
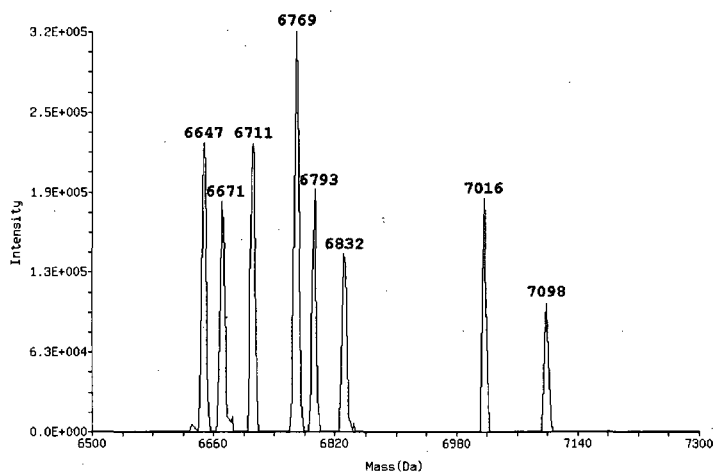


Figure 4. Mécanisme d'action des DsiRNA A) Reconnaissance des DsiRNA par Dicer et prise en charge des produits de clivage par RISC. B) Site d'incorporation des 21-mers classiques en aval de l'étape de clivage par Dicer.

À la suite de ces constats, l'équipe d'IDT a poussé ses recherches afin de savoir si l'efficacité des 27-mers était le résultat de l'action conjuguée des différents produits de clivage ou si un seul de ces produits était responsable de l'activité inhibitrice (ROSE et al. , 2005). En effet, il n'y a aucun moyen de déterminer, sur un duplex normal, l'endroit exact où aura lieu le clivage. Par exemple, un duplex de 27 nt à bout franc peut donner jusqu'à 5 produits de clivage différents (**Figure 5a**). Par contre, il est possible de favoriser certains sites de clivage en modifiant le duplex. D'abord, le simple fait

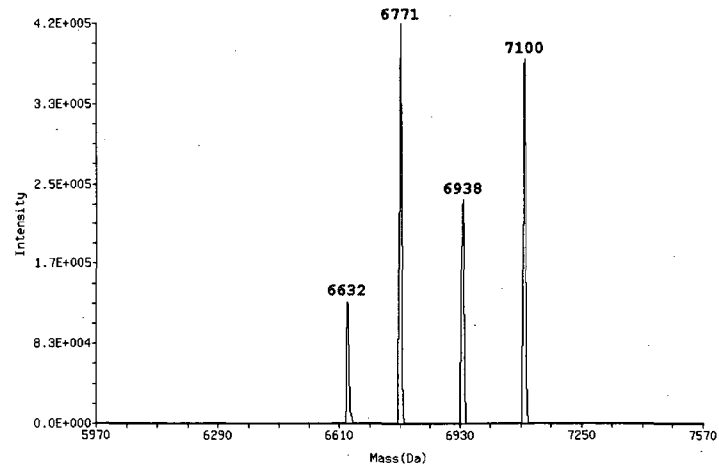
d'enlever 2 nt à une extrémité d'un des deux brins permet d'orienter le clivage ce qui résulte en seulement 2 à 4 produits (**Figure 5b**). Finalement, on peut prendre ces duplex « coupés » et remplacer le ribose des 2 bases en 3' du brin plus court par des désoxyriboses (qui forment l'ADN et non l'ARN). Ce duplex doublement modifié sera inmanquablement clivé afin que ces deux bases d'ADN ne soient pas conservées ne rendant qu'un seul produit possible (**Figure 5c**). Il s'est avéré que cet unique produit de clivage peut être plus efficace que toutes les autres combinaisons de produits testés lorsque vient le temps d'inhiber l'expression de la protéine EGFP. À la lumière des expériences effectuées avec les deux duplex, il a été montré que le brin anti-sens doit être celui qui comporte 27nt et que le brin de 25nt contenant des bases d'ADN à son extrémité 3' doit être le brin sens. Cette configuration est plus efficace que les autres testées (ROSE et al. , 2005).

A



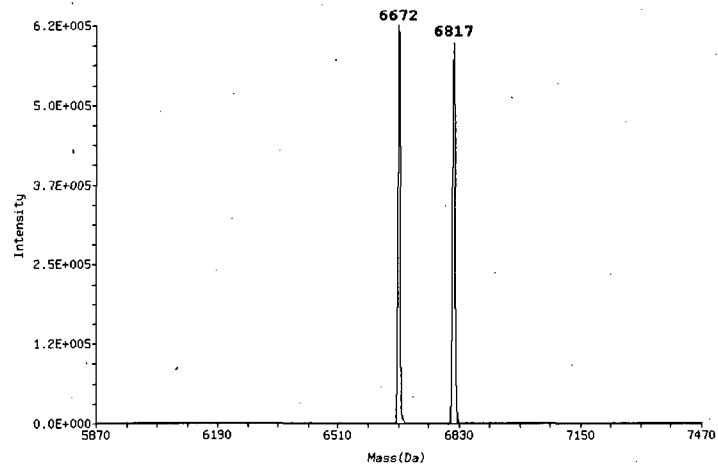
Sequence: EGFPS2 R 27/27		Mol Wt	Length
5'	AAGCAGCAGACUUCUUCAAGUCCGCC	8551	27
3'	UUCGUCGUGCUGAAGAAGUUCAGGCGG	8705	27
5'	pCAGCAGACUUCUUCAAGUCCGCC	6648	21
3'	UCGUGCUGAAGAAGUUCAGGCP	6832	21
5'	pAGCAGCAGACUUCUUCAAGUCCG	6712	21
3'	CGUCGUGCUGAAGAAGUUCAGp	6832	21
5'	pCAGCAGCAGACUUCUUCAAGUCC	6672	21
3'	UCGUGCUGCUGAAGAAGUUCAp	6793	21
5'	pGCAGCAGCAGACUUCUUCAAGUC	6712	21
3'	UUCGUCGUGCUGAAGAAGUUCp	6770	21
5'	pGCAGCAGCAGACUUCUUCAAGUCC	7017	22
3'	UUCGUCGUGCUGAAGAAGUUCAp	7099	22

B



Sequence: EGFPS2 R 25/27		Mol Wt	Length
5'	GCAGCACGACUUCUUCAAGUCCGCC	7893	25
3'	UUCGUCGUGCUGAAGAAGUUCAGGCGG	8705	27
	GCAGCACGACUUCUUCAAGUC	6632	21
3'	UUCGUCGUGCUGAAGAAGUUC _p	6770	21
	GCAGCACGACUUCUUCAAGUCC	6937	22
3'	UUCGUCGUGCUGAAGAAGUUC _{A_p}	7099	22

C



Sequence: EGFPS1 R 25D/27		Mol Wt	Length
5'	pACCCUGAAGUUCAUCUGCACCAC _{cg}	7925	25
3'	ACUGGGACUUCAAGUAGACGUGGUGGC	8728	27
5'	pACCCUGAAGUUCAUCUGCACC	6672	21
3'	ACUGGGACUUCAAGUAGACG _{U_p}	6816	21

Figure 5. Analyse en spectrométrie de masse des produits de clivage par Dicer. A) Le duplex à bout franc (27/27) résulte en 5 produits de clivage différents. B) Le duplex avec une extension en 3' (25/27) donne 2 produits. C) le duplex avec une extension en 3' et 2 bases d'ADN (25D/27) ne donne qu'un seul produit de clivage (adapté de Rose SD, 2005).

C'est ainsi qu'un protocole standardisé a été développé, permettant de faire le design des *Dicer substrate siRNA* (DsiRNA) selon les critères établis et de les administrer à des cellules RAW 267.4 pour induire l'interférence du gène ciblé (AMARZGUIOUI et al. , 2006). Il a été observé qu'il était possible d'obtenir une inhibition 100 fois plus efficace qu'avec les siRNA classiques en considérant le résultat sur l'expression et les concentrations utilisées (KIM et al. , 2005). Il ne restait plus maintenant qu'à valider l'administration *in vivo* des DsiRNA.

1.5 Outils de transport et de distribution

L'étape cruciale avant l'application *in vivo* des siRNA dans le développement de nouvelles thérapies est l'avancement des techniques d'acheminement de ces molécules vers leurs tissus cibles. Les formulations doivent donc concentrer les siRNA vers le site visé tout en les protégeant de la dégradation par les endo/exonucléases contenues dans le sang et le sérum. Plusieurs formulations synthétiques ont été élaborées afin d'adresser ces problématiques. Ces systèmes de transport ont pour effet de réduire considérablement les doses de siRNA administrées en favorisant l'adressage tissulaire et la pénétration et une inhibition plus efficace. Les systèmes les plus utilisés sont les lipofectants (lipides cationiques) et les polymères (AKHTAR et BENTER, I. F. , 2007).

1.5.1 Lipoplexes cationiques

Les lipides cationiques sont des composés amphiphiles qui partagent plusieurs des propriétés des phospholipides naturels qui composent la membrane cellulaire. Ils forment des nanoparticules ou complexes, qui enveloppent l'acide nucléique et lui permettent d'être transporté dans la circulation sanguine jusqu'à la cellule cible. Ils ont donc tendance à former des bicouches dans un milieu aqueux (**Figure 6**). Leur principale caractéristique, leur charge externe positive, fait en sorte qu'ils interagissent naturellement avec les phospholipides de la membrane cellulaire qui sont chargés négativement à pH physiologique (charge nette). C'est aussi pour cette raison que les liquides de transfection de type lipide cationique prennent facilement en charge les siRNA, qui sont aussi négatifs.

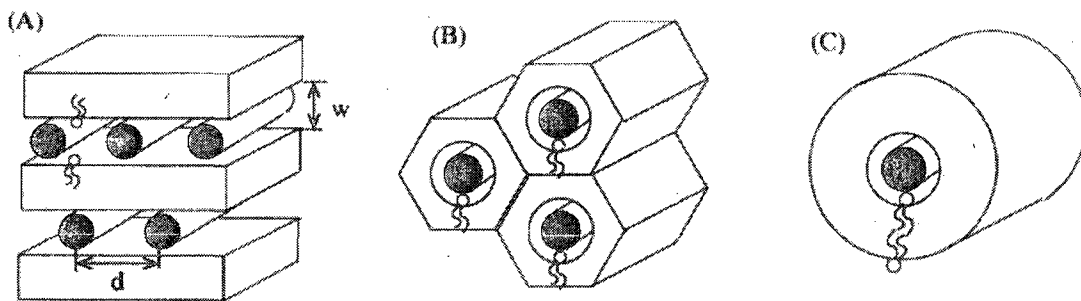


Figure 6. Les trois principales conformations possibles des complexes amphiphiles lipides cationiques-acides nucléiques. A) Conformation en bicouches superposées. B) Conformation hexagonale ou « nid d'abeille ». c) Conformation tubulaire. Les zones légèrement ombragées représentent des bicouches lipidiques alors que les cercles noirs représentent le cœur formé par les acides nucléiques.

Plusieurs études montrent que c'est par endocytose et non par fusion directe que les vésicules pénètrent la cellule cible (FRIEND et al. , 1996, ZUHORN et HOEKSTRA,D. , 2002, KHALIL et al. , 2006). Cependant, l'identité des molécules de surface requises

pour l'adhésion du lipoplexe à la cellule avant l'endocytose reste très mal connue. Suite à l'intégration dans l'endosome, des interactions se produisent avec les phospholipides acides endosomaux et déstabilisent la membrane de cette vésicule (**Figure 7**). Certains composés sont d'ailleurs spécialement conçus pour déstabiliser la membrane des endosomes contenant les siRNA dans la cellule ce qui entraîne leur relâche dans le cytoplasme. Ainsi, le DOTAP (N-[1-(2,2-dioleoyloxy)]-N,N,N triméthyle ammonium propane) et le DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride), en raison de leur charge positive, ont rencontré un certain succès dans des études *in vitro* (STAMATATOS et al. , 1988). C'est à la suite de cette déstabilisation que le matériel contenu dans les lipoplexes cationiques est relâché dans le cytoplasme. La plupart de ces composés ont fait l'objet de tentatives de transfection *in vivo* (SORENSEN et al. , 2003, VERMA et al. , 2003).

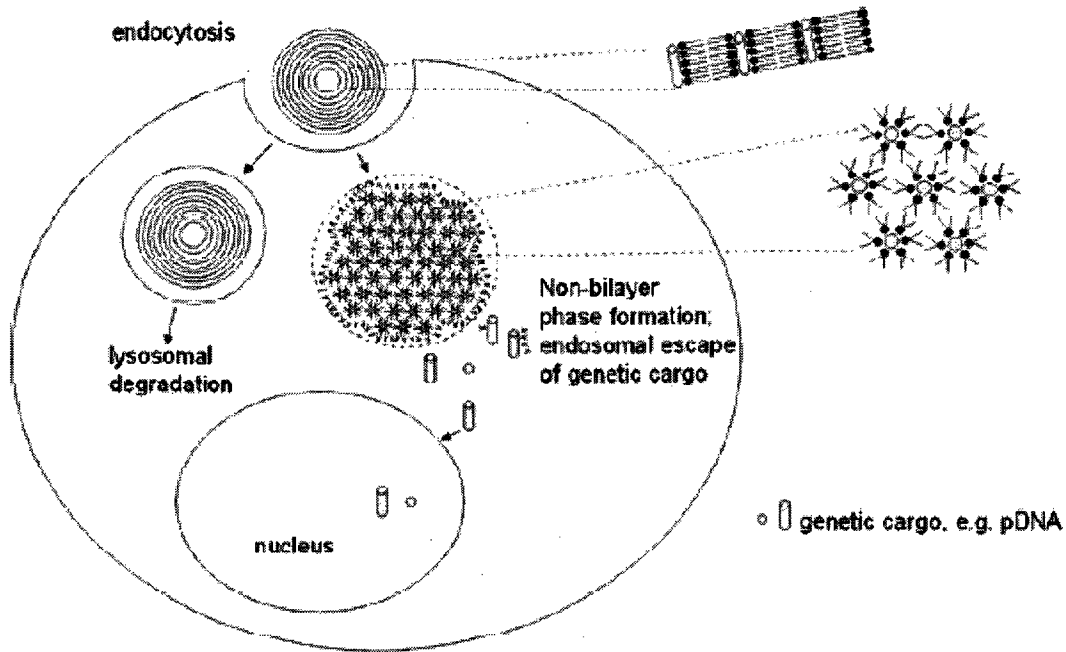


Figure 7. Prise en charge cellulaire d'un complexe de lipides cationiques par endocytose. Les lipides du lipoplex s'entremêlent avec les phospholipides de l'endosome ce qui déstabilise la membrane et favorise la relâche du contenu (acides nucléiques) de ce lipoplex.

Certaines questions demeurent quant à l'utilisation de ces transfectants en rapport avec leur potentielle toxicité (AKHTAR et BENTER, I. , 2007) et une possible induction du système immunitaire (KIM et al. , 2007) mais l'avenue est prometteuse puisqu'elle contribue à régler en grande partie des problèmes liés à la dégradation, la distribution et la pénétration. De plus, ces lipofectants permettent aux utilisateurs de siRNA d'en diminuer les doses. Malgré les récentes avancées, il n'y a qu'une seule étude clinique, en 2008, proposant l'utilisation de ces transporteurs lipidiques (clinicaltrials.gov #NCT00004471). Le principal élément freinant l'augmentation des essais clinique est l'inquiétude qui persiste par rapport aux possibles effets toxiques de ces composés. En effet, il a été rapporté que les lipides cationiques induisent des effets délétères sur les cellules. Selon la dose et la lignée cellulaire utilisée, il peut s'agir du rétrécissement des

cellules, d'une diminution de la mitose ou d'une vacuolisation du cytoplasme (LAPPALAINEN et al. , 1994). L'activité de la protéine kinase DAI, le principal effecteur de la réponse à l'interféron, est elle aussi altérée(MANCHE et al. , 1992). La production de superoxyde peut également se voir augmentée (DASS. , 2002). Finalement, la structure unique de ces lipides peut les rendre non-dégradables. C'est le cas du DOTMA qui s'accumule dans l'organisme lors de traitements répétés. Des effets toxiques ont donc été observés dans le cadre d'administrations systémiques. Ainsi, l'injection intra-veineuse de lipoplexes a causé de l'hépatotoxicité et de la néphrotoxicité, chez la souris et le rat respectivement (MOHR et al. , 2001, MADRY et al. , 2001) L'hypothèse la plus acceptée quant à la cause de cette toxicité est l'excès de charge positive. Par conséquent, le lipoplexe formé par le lipide et l'acide nucléique est supposé moins dommageable que le lipide seul puisque la charge nette est alors moins positive. Il est important de faire une distinction entre ces deux états du lipide qui peuvent engendrer des effets d'ampleur différente.

Certaines formulations de liposome facilitent le passage des molécules à travers la barrière hématoencéphalique. Ils sont habituellement composés d'une enveloppe lipidique et de molécules de surface servant soit au transport, à la stabilité ou au passage à travers les membranes. **La figure 8** montre les différentes molécules qui peuvent se trouver en surface du liposome. Il peut s'agir d'un anticorps spécifique au récepteur membranaire transferrine qui se trouve à la surface des cellules donnant sur la lumière vasculaire. Une fois lié à un antigène, ce récepteur traverse la barrière

hématoencéphalique en entraînant avec lui le liposome. On peut également utiliser des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) pour améliorer la stabilité du liposome pendant qu'il circule dans le sang. Finalement, la relâche du contenu du liposome se produit grâce aux peptides ou lipide qui déstabilisent les membranes des endosomes.

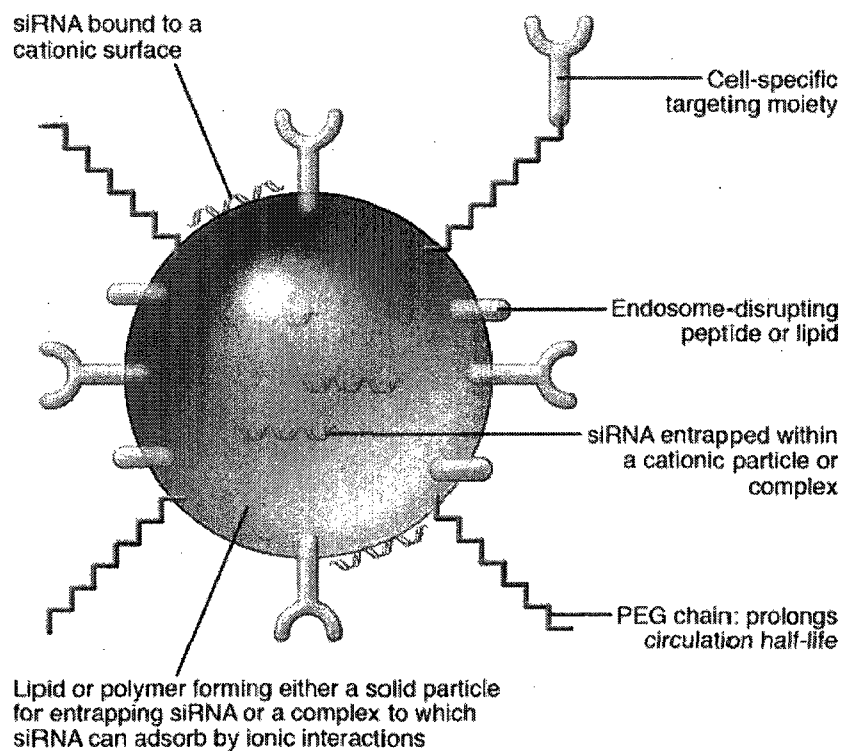


Figure 8. Représentation schématique des composants structuraux d'un complexe cationique pour le transport de siRNA in vivo (AKHTAR et BENTER, I. F. , 2007). On peut voir la molécule de siRNA en surface ou à l'intérieur, les lipides ou polymères qui forment la capsule, les anticorps spécifiques à un type de cellules, les peptides dégradant les endosomes et les chaînes de polyéthylène glycol (PEG) protégeant le complexe cationique de la dégradation dans le sang.

Plus récemment, des chercheurs ont développé des produits de transfection ciblant le système nerveux central. La compagnie Neuromics a exploité les propriétés des lipides cationiques en proposant le i-Fect (TSUI et al. , 2006). Le i-Fect est de plus en plus utilisé pour cibler le système nerveux. En effet, des *knockdown* spécifiques ont été réussis par

plusieurs groupes différents au cours des dernières années sur diverses cibles au niveau central. Par exemple, il a été possible d'inhiber l'expression du récepteur opioïde delta dans la moelle épinière et dans les ganglions de la racine dorsale (LUO et al. , 2005), du canal sodique $Na_v1.8$ chez des rats neuropathiques (DONG et al. , 2007) ou de prévenir des infections virales dans le cerveau (KUMAR et al. , 2006). Ces interventions ont été exécutées à l'aide de doses plus faibles de siRNA que lorsqu'aucun transfectant n'est utilisé. Par contre, les effets cytotoxiques n'ont fait l'objet d'aucune analyse et auraient dû être adressés en utilisant plusieurs doses et volumes d'injection. Néanmoins, le i-Fect demeure la principale option disponible pour les expériences d'interférence dans le système nerveux central.

1.5.2 Polymères cationiques

Les structures polymériques cationiques lient les acides nucléiques et les condensent. Ils sont maintenant utilisés pour le transport de siRNA. La grande quantité de charges positives de la chaîne polymérique lui permet d'abaisser le pH des endosomes et d'en préserver les siRNA. Le polyéthylèneimine (PEI) est le polymère le plus utilisé et certaines études démontrent son efficacité dans le système nerveux central dans des pathologies telles que la douleur chronique, le cancer ou les infections virales (TAN et al. , 2005, SCHIFFELERS et al. , 2004, GEISBERT et al. , 2006, GEISBERT et al. , 2006) . Cependant, les PEI induisent des variations géniques non désirées dépassant le cadre de leur rôle de transporteur. Plusieurs études ont montré un effet anti-tumoral causé par l'induction de gènes proapoptotiques et de cytokines. Ces propriétés anti-néoplasiques

impliquent également une toxicité pour les autres cellules de l'organisme, plus ou moins importante selon le polymère utilisé (MOROSON. , 1971, OMIDI et al. , 2005). La communauté scientifique doit donc se montrer prudente dans l'analyse des résultats d'expériences utilisant ce type d'agent de transfection (AKHTAR et BENTER,I. , 2007).

C'est donc principalement pour des raisons de sécurité ou de spécificité de l'action que les outils de transfections cationiques tels les liposomes ou les polymères ne sont encore que très peu utilisés en étude clinique. Les études chez l'animal avec des siRNA représentent en même temps le banc d'essai pour les différentes formulations mises au point récemment et celles à venir.

1.5.3 Vecteurs viraux

L'utilisation de vecteurs viraux s'impose lorsqu'on utilise des *short-hairpin RNAs* (shRNA). Ces composés imitent des microséquences d'ARN (miRNA), une version endogène des siRNA capable d'interférence.

Plusieurs types de virus peuvent être utilisés comme vecteur pour acheminer les siRNA vers leur cible, selon le type de cellule et l'effet recherché. Habituellement, les adénovirus et le virus de l'herpes sont utilisés pour une expression à court terme alors que les *adeno-associated viral vectors* (AAV), les rétrovirus et les lentivirus sont utilisés pour une expression prolongée ou pour des cellules qui ne se divisent pas (MARTIN et CAPLEN,N. J. , 2007). Il a d'abord été montré qu'il était possible d'inhiber l'expression

de gènes marqueurs (GFP) chez des embryons de souris à l'aide de lentivirus (TISCORNIA et al. , 2003). Le concept a ensuite été appliqué à des gènes propres à l'animal. Les virus de type AAV8 peuvent servir de vecteur pour l'interférence au niveau des DRG lorsqu'ils sont injectés de façon systémique. Ces virus ciblant les neurones moteurs sont transportés de façon rétrograde le long des afférences primaires pour ensuite infecter les DRG et relâcher les shRNA dans les cellules (FOUST et al. , 2008).

En plus des siRNA eux-mêmes, les vecteurs de transport des siRNA peuvent aussi être responsables de l'induction de la réponse immunitaire (AKHTAR et BENTER,I. , 2007). Par exemple, les liposomes cationiques peuvent intégrer les macrophages et engendrer l'activation des cellules immunitaires NK qui sécrètent de l'interféron- γ (AUDOUY et al. , 2002). De la même manière, les vecteurs viraux peuvent eux aussi activer le système immunitaire en stimulant la sécrétion de cytokines telles que IL-6, IL- β , TNF- α , IFN- γ et IL-12 (COTTER et MURUVE,D. A. , 2005).

En résumé, peu importe le système de transport utilisé, les questions que l'on doit se poser lorsqu'on désire utiliser des siRNA formulés pour inhiber l'expression d'un gène sont :

- Quel est l'organe ou la cellule cible?
- Quelle est la voie d'administration assurant un accès sécuritaire vers l'organe?
- Comment optimiser la relâche des siRNA dans le cytoplasme sans compromettre l'efficacité de transfection?

- Comment réduire les effets indésirables?

C'est vers ces différents points que se dirigera la recherche dans le domaine des systèmes de transport des acides nucléiques.

2. La Douleur

Un des domaines où la recherche de nouveaux traitements s'est beaucoup intensifiée récemment est celui de la douleur et des analgésiques. De plus, les pathologies touchant le système nerveux central suscitent un intérêt particulier étant donné le défi qu'elles représentent au niveau accès et acheminement des composés pharmacologiques. C'est pourquoi nous avons développé une collaboration avec la compagnie IDT afin d'utiliser notre plate-forme comportementale chez les rongeurs ainsi que notre expertise dans le domaine de la neurophysiologie de la douleur pour tester leur approche d'inactivation génique par les DsiRNA.

La douleur est une réaction normale de notre organisme en réponse à une agression extérieure. Cette réponse est d'abord immédiate, violente et localisée. C'est ce que l'on appelle la douleur aiguë. Par la suite, la douleur prend une forme plus persistante et diffuse : il y a formation d'une zone douloureuse plus grande que celle atteinte par le stimulus original. On parle alors de douleur tonique. La douleur peut persister pendant plusieurs mois et atteindre un état dit chronique. La douleur chronique (qui persiste pendant plus de 3 à 6 mois) est un problème émergent de santé publique important qui

engendre des coûts socio-économiques importants. Beaucoup d'énergie est déployée en ce moment dans la recherche d'agents thérapeutiques pour en réduire les conséquences.

2.1 Définition

L'Association internationale pour l'étude de la douleur définit la douleur comme une sensation désagréable et une expérience émotionnelle en réponse à une atteinte tissulaire potentielle ou réelle, ou décrite en ces termes (MERSKEY et BOGDUK, N. , 1994).

2.2 Nociception

2.2.1 Nocicepteurs et afférences primaires

Les nocicepteurs sont les neurones à terminaisons libres responsables de la transmission du signal douloureux. Ils possèdent plusieurs récepteurs chargés de détecter les différents stimuli nociceptifs selon leur nature et leur intensité (**figure 9**). Ces terminaisons se situent en périphérie dans chaque recoin de la peau et des organes internes et conduisent le signal jusqu'à la moelle épinière, en passant par leur corps cellulaire situé dans les ganglions nerveux trigéminaux ou rachidiens dorsaux (DRG). Les fibres afférentes peuvent se classer en trois catégories distinctes selon leur diamètre, le seuil de

déclenchement et leur vitesse de transmission du signal électrique nociceptif (ou non-nociceptif) (Figure 10).

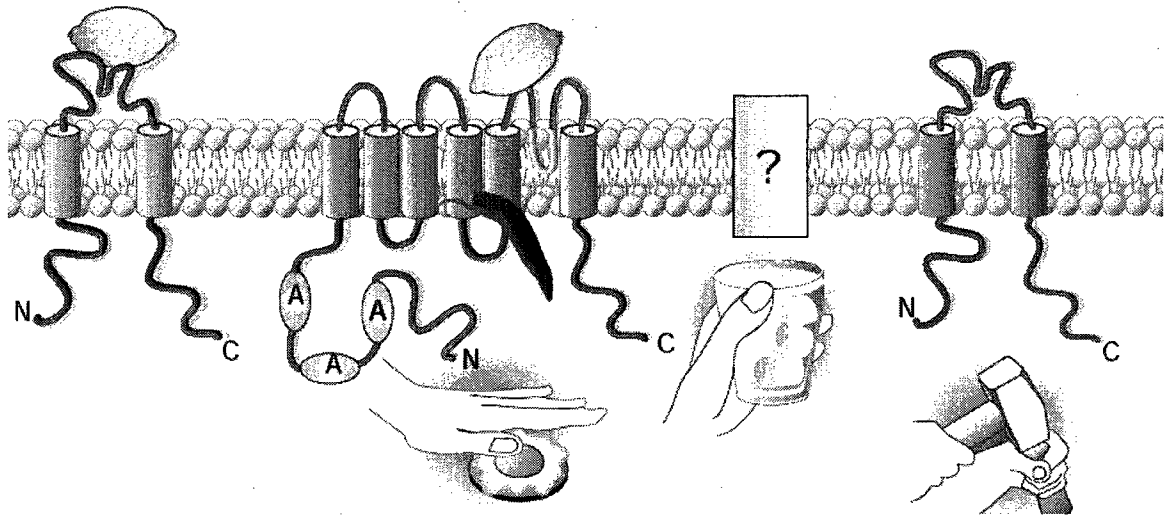


Figure 9. Récepteurs se trouvant à la surface des nocicepteurs. De gauche à droite : le canal sensible à l'acide (ASIC), le récepteur VR1 détectant plusieurs types de stimuli tels que la chaleur, l'acide ou les substances chimiques comme la capsaïcine et les canaux sodiques épithéliaux qui détectent les stimuli mécaniques (ENaC). Le canal responsable de la détection du froid n'est pas encore clairement identifié mais certaines évidences suggèrent que le récepteur TRPA1 pourrait être un candidat intéressant. En effet, son seuil de détection des stimuli thermique est à 17°C et moins (Julius et Basbaum, 2001; Tominaga et Caterina, 2004).

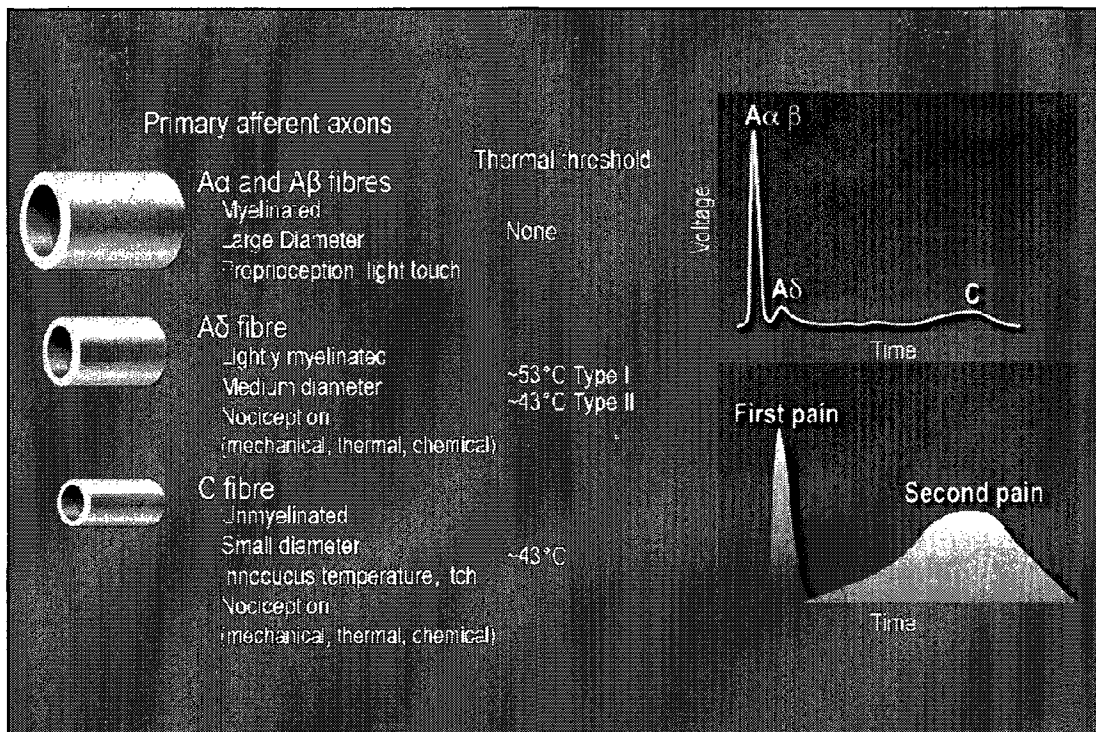


Figure 10. Les différentes fibres afférentes primaires. Il existe 3 types de fibres afférentes primaires; les fibres A $\alpha\beta$, A δ et C. Elles se différencient par leur niveau de myélinisation et leur diamètre. Seules A δ et C sont considérées comme des nocicepteurs (Julius et Basbaum, 2001).

Les fibres A α et A β sont les fibres les plus larges et les plus densément myélinisées. La transmission se fait donc très rapidement, en quelques millisecondes, et elles sont sensibles aux stimuli les plus fins. Ces fibres sont considérées comme non-nociceptives et responsables des sensations tactiles et de la proprioception. Les fibres A δ sont des neurones moins myélinisés et de diamètre moyen. Elles permettent aussi la transmission rapide d'un stimulus et ne déclenchent un signal que dans le cas d'un stimulus nociceptif, qu'il soit mécanique, thermique ou chimique. C'est par ces fibres que la première perception de la douleur se produit. Par contre, la douleur plus persistante qui élance et couvre une zone plus grande que celle atteinte par le stimulus résulte de la stimulation

des fibres C. Ces dernières sont connues pour leur sensibilité à la capsaïcine et leur absence de myéline. Sans cet isolant, ces fibres nociceptives à petit diamètre transmettent l'information nociceptive de façon beaucoup plus lente (environ 1 m/s). Il est aussi possible de catégoriser les fibres en certaines sous-classes selon leur seuil de décharge ou encore leur empreinte neurochimique. Les fibres A δ sont donc séparées en deux classes selon qu'elles détectent des stimuli thermiques de haute (53°C; type 1) ou basse (43°C, type 2) température. Aussi, il existe des fibres C dites peptidergiques, par opposition aux fibres non-peptidergiques. Les neurones peptidergiques expriment entre autres la substance P et le récepteur TrkA, qui lie fortement le *Nerve Growth Factor*. Les fibres non-peptidergiques n'expriment pas ces substances, mais plutôt la lectine IB4 et le récepteur à l'ATP P2X₃. Nous commençons seulement à comprendre en quoi ces sous-populations de neurones sont fonctionnellement différentes. Par contre, des changements dans ces deux sous-populations ont été démontrés dans des cas de douleur neuropathique (dommages aux nerfs) (JULIUS et BASBAUM, A. I., 2001).

2.2.2 Les récepteurs de la nociception

Une bonne variété de récepteurs présents sur les nocicepteurs peuvent induire un signal nociceptif. Parmi ceux-ci, les récepteurs aux vanilloïdes (comme la capsaïcine) tels que VR1 et VRL-1 sont présents sur les fibres C, entre autres, et permettent de détecter des stimuli thermiques et chimiques. Les canaux sensibles à l'amiloride (ASIC) sont aussi des récepteurs capables de détecter un stimulus chimique, plus précisément les conditions acides. En effet, le pH d'un tissu victime d'inflammation peut baisser considérablement

ce qui entraîne l'activation de ces récepteurs de type canaux sodiques. D'autres canaux sodiques détectent les stimulations mécaniques (de la famille ENaC/DEG). Il y a finalement une panoplie de facteurs inflammatoires qui peuvent provoquer un influx nociceptif en liant leur récepteur pro-nociceptif respectif. La **figure 11** montre plusieurs exemples.

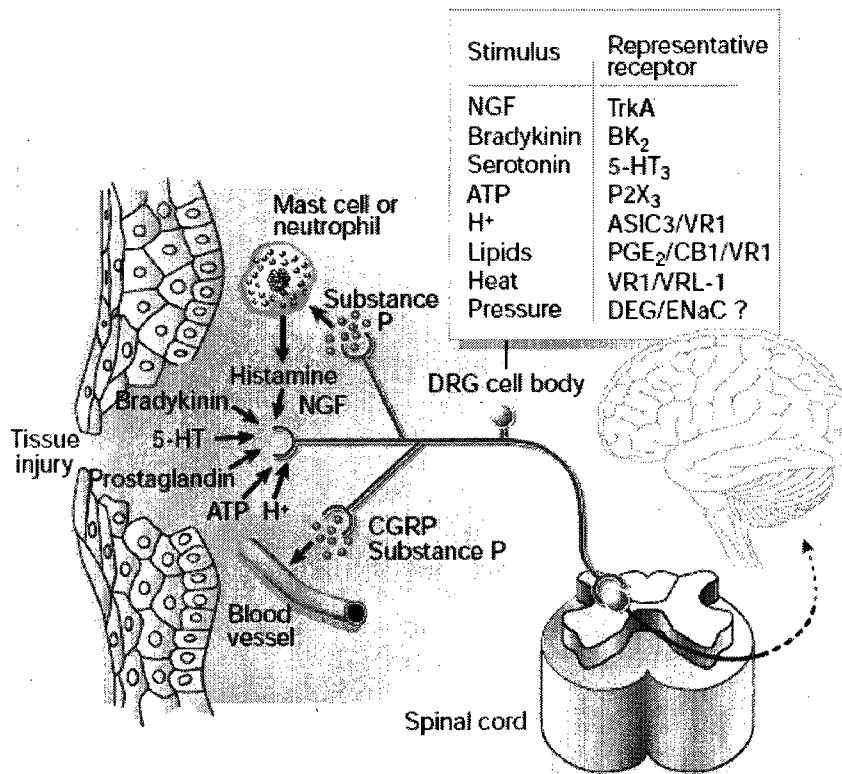


Figure 11. Différents médiateurs inflammatoires relâchés par un tissu lors d'une blessure. Ces facteurs stimulent leurs récepteurs présents sur les nocicepteurs et produisent un signal nociceptif (Julius et Basbaum, 2001).

2.2.3 La moelle épinière

2.2.3.1 Voies ascendantes

Les afférences primaires transportent l'influx nociceptif vers la moelle épinière. C'est là que se produira le premier relais synaptique dans les processus d'acheminement, appelés voies ascendantes de la nociception, vers les centres supérieurs (tronc cérébral et cerveau) (**Figure 12**). Il y a deux voies ascendantes principales, la voie spinoparabrachiale et la voie spinothalamique. La première provient des laminae I et II de la moelle et transporte l'information vers des centres responsables de l'assimilation au niveau émotionnel de la douleur comme l'amygdale et l'hypothalamus. La voie spinothalamique assure une transmission jusqu'à des régions corticales chargées de l'assimilation de la nature et de la localisation de la stimulation en passant par le thalamus (HUNT et MANTYH, P. W. , 2001).

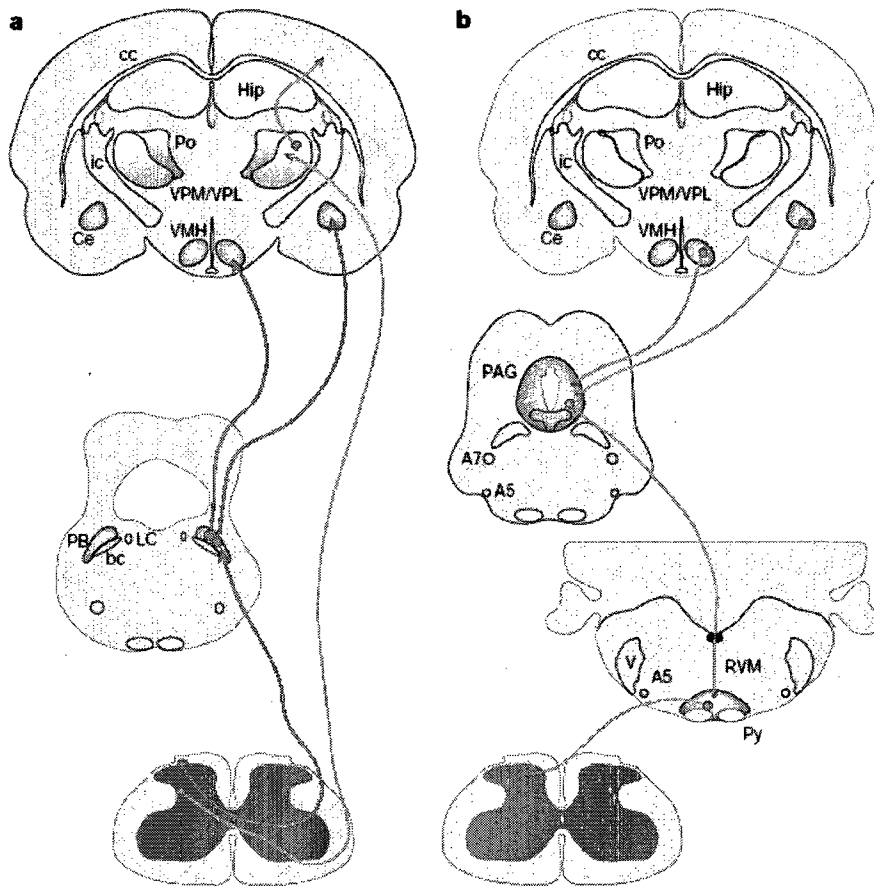


Figure 12. Les principales voies ascendantes et descendantes passant de la moelle épinière au tronc cérébral pour se terminer au cerveau, et vice-versa. A) Les voies ascendantes dites spino-parabrachiales (flèches rouges) et spinothalamiques (flèches bleues). B) Les principales voies descendantes. A : noyaux adrénergiques, bc : brachium conjunctivum, cc : corps calleux, Ce : noyaux central de l'amygdale, Hip : hippocampe, ic : capsule interne, LC : locus coeruleus, PB : aire parabrachiale, Po : groupe postérieur des noyaux thalamiques, Py : faisceau pyramidal, RVM : medulla rostroventrale, V : ventricule, VMH : noyaux ventro-médian de l'hypothalamus, VPL : noyau ventral postériorlatéral du thalamus, VPM : noyau ventral postériorlatéral du thalamus (Hunt et Mantyh, 2001).

2.2.3.2 Voies descendantes

Une fois l'information nociceptive assimilée par les centres supérieurs, des voies descendantes inhibitrices sont activées au niveau de la substance grise périaqueducale. Les neurones de cette région relâchent des neurotransmetteurs inhibiteurs de la nociception tels que la sérotonine et la noradrénaline. Ces neurotransmetteurs vont agir

en inhibant les neurones de projections qui font le relais entre les afférences primaires et les centres supérieurs. Il en résulte un contrôle de la douleur qui limite la quantité d'influx nociceptif qui parvient au niveau supraspinal (**figure 13**). Il existe toute une série de neurotransmetteurs qui peuvent avoir un effet inhibiteur au niveau de la moelle épinière alors que d'autres sont facilitateurs (MILLAN. , 2002). Certains neurotransmetteurs peuvent même être à la fois inhibiteurs et facilitateurs selon la région ou encore le récepteur stimulé. Par exemple, la sérotonine est inhibitrice par le récepteur 5HT₃ alors qu'elle est facilitatrice par le 5HT_{1A}. De la même manière, le monoxyde d'azote est facilitateur dans les ganglions de la racine dorsale mais inhibiteur dans les interneurons spinaux.

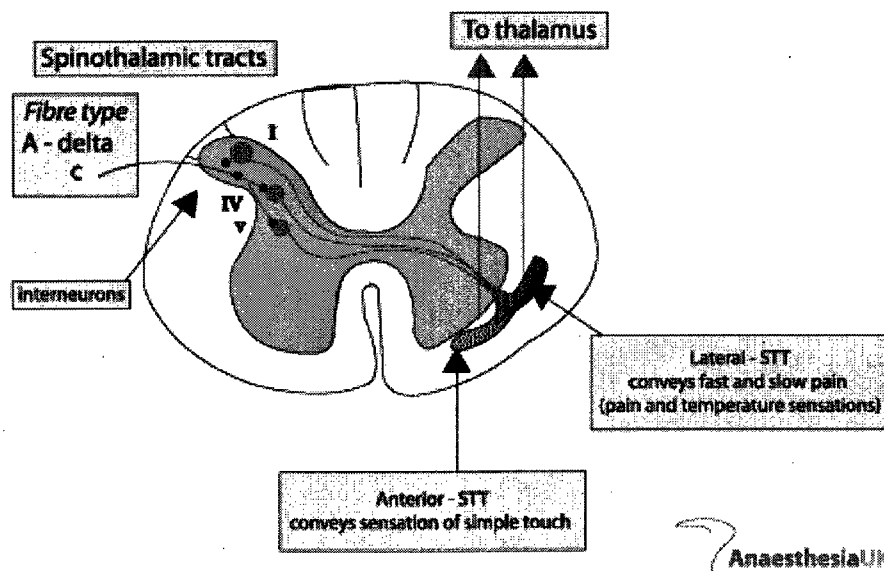


Figure 13. Inhibition de la nociception au niveau spinal. Les neurones provenant du tronc cérébral (rouge) relâchent leurs neurotransmetteurs inhibiteurs (sérotonine, noradrénaline, etc.). L'influx nociceptif est alors bloqué soit directement par ces neurotransmetteurs soit par les interneurons inhibiteurs qui peuvent eux aussi sécréter des molécules inhibitrices comme l'énképhaline

Les interneurons inhibiteurs sont actifs lorsque l'acheminement d'un influx douloureux n'est pas nécessaire, c'est-à-dire lorsque les neurones A β sont plus fortement stimulés

que les A δ . Ils libèrent des substances inhibitrices comme de l'enképhaline, de la **neurotensine** ou du GABA pour bloquer l'influx nociceptif.

2.3 Traitement de la douleur

La douleur est le plus souvent traitée à l'aide d'un ou plusieurs agents pharmacologiques. L'organisation mondiale de la santé a produit des lignes directrices pour le traitement de la douleur qui servent encore aujourd'hui de référence pour les omnipraticiens, les anesthésistes et les médecins prodiguant des soins palliatifs, post-opératoires ou encore d'urgence. Il s'agit d'une échelle à trois niveaux qui correspond à des échelons d'intensités et d'agressivité dans le traitement de la douleur ressentie. Les composés les plus utilisés sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui donnent un bon rendement dans le traitement de la douleur aiguë légère. Citons dans cette classe l'acétaminophène et l'ibuprofène. Il a aussi été montré récemment qu'ils peuvent aider à réduire les doses de co-analgésiques plus puissants. Les AINS conviennent aux douleurs musculosquelettiques reliées à l'arthrite. Ils partagent le fait qu'ils sont inhibiteurs des cyclooxygénases ce qui limite la production de prostaglandines. Malgré leur effet analgésique modéré, leur utilisation est limitée par plusieurs effets secondaires indésirables. L'hémorragie gastrointestinale, la nausée, l'insuffisance rénale ou hépatique ainsi que l'insuffisance cardiaque en font partie.

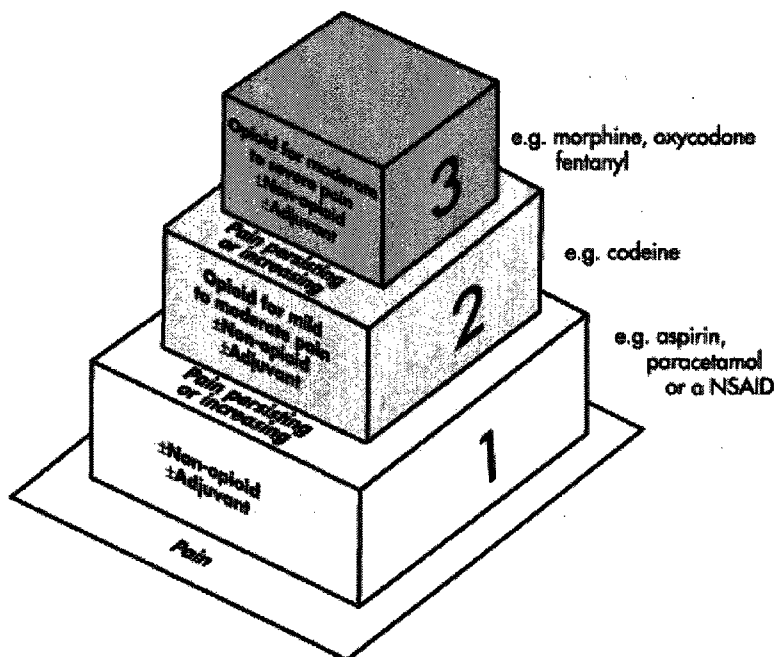


Figure 14. Échelle de traitement de la douleur de l'Organisation mondiale de la santé. Niveau 1 : AINS tels que l'acétaminophène et l'ibuprofène. Niveau 2 : Opioides pour douleurs faibles à modérées tels que la codéine. Niveau 3 : Opioides forts et de longue durée tels que la morphine et le fentanyl.

Les opioïdes sont utilisés à partir du niveau 2 de l'échelle de l'OMS. La codéine, par exemple, peut être utilisée en combinaison avec l'acétaminophène et donne de bons résultats pour une douleur persistante. D'autres opiacés plus puissants tels la morphine, l'hydromorphone et la mérépidine (Démérol) sont prescrits pour des douleurs plus sévères. Les doses et la fréquence de leur administration peuvent varier selon le composé et la voie d'administration utilisée. Ce sont d'ailleurs des paramètres auxquels les cliniciens doivent porter une attention particulière étant donné les dangers de dépression respiratoire que ces médicaments peuvent entraîner. Les autres effets secondaires fréquents des opiacés sont la constipation et la nausée lors d'utilisation fréquente. Des effets plus graves de dépression respiratoires et le développement de dépendance et de tolérance plus rare chez l'humain, peuvent survenir.

La douleur neuropathique (causée par des dommages directs aux nerfs ou au système nerveux central) est un cas particulier puisqu'elle est reconnue comme étant relativement résistante aux opiacés. Par conséquent, plusieurs classes de médicaments connues pour leur efficacité dans d'autres pathologies sont utilisées en douleur neuropathique faute de traitement spécifique plus efficace. Les antidépresseurs, les anticonvulsivants les antiarythmiques et des opioïdes multivalents (agissant sur plusieurs systèmes) sont parmi les types de composés les plus répandus. Un intérêt nouveau pour la kétamine et les cannabinoïdes provoque aussi de l'engouement chez les chercheurs cliniciens et fondamentaux. Chacun de ces groupes de médicaments comporte des effets secondaires qui en limite l'utilisation chez une majorité de patients ce qui fait en sorte que ceux souffrant de douleur neuropathique (et de douleur chronique au sens large) sont toujours en attente de traitements novateurs moins lourds et plus faciles à supporter au quotidien. La **neurotensine** est un peptide possédant des propriétés analgésiques faisant l'objet d'études dans notre laboratoire afin d'en évaluer le potentiel comme traitement pharmacologique pour le traitement de la douleur chronique.

3. Neurotensine

La neurotensine (NT) est un peptide de 13 acides aminés isolé en 1973 d'un hypothalamus de bovin (CARRAWAY et LEEMAN, S. E. , 1973). Peu de temps après, elle a été identifiée dans le système digestif de cette même espèce (KITABGI et al. , 1976). La NT doit son nom à sa propriété d'hypotenseur. Il a été montré plus tard que les

acides aminés 8 à 13 sont les seuls requis pour l'activité physiologique de la NT (**Figure 14**). Cette séquence est en effet hautement conservée d'une espèce à l'autre, alors que les acides aminés 1 à 7 sont relativement variables (ROSTENE et ALEXANDER, M. J. , 1997). La NT est un des produits du clivage d'un long précurseur, la pro-NT/NN (169 acides aminés). Il s'agit du même précurseur que pour la neuromédine N, un petit peptide apparenté qui partage certaines des propriétés de la NT (KITABGI. , 2006a). La pro-hormone convertase impliquée dans le clivage de la pro-NT/NN dépend du tissu étudiée. La PC1 et la PC5 clivent le précurseur dans l'intestin alors que c'est la PC2 qui fait ce travail au niveau cortical (KITABGI. , 2006b). Parmi les autres propriétés physiologiques de la neurotensine, on note la thermorégulation, la régulation du système dopaminergique, l'inhibition de la prise alimentaire, la modulation de nombreuses hormones relâchées par l'hypophyse et l'**analgsie opioïde-indépendante**.



Figure 15. Séquence peptidique de la neurotensine. Les 6 acides aminés dans la partie rouge, en C-terminal, sont ceux requis pour l'activité physiologique de la neurotensine.

3.1 Distribution dans le système nerveux central

3.1.1 Cerveau

Chez le rat, le modèle animal le plus étudié dans le cadre de la recherche sur la NT, les plus grandes concentrations de neurotensine ont été observées dans l'hypothalamus, l'amygdale, et certains noyaux du tronc cérébral (**Figure 15**). Plus précisément, des

neurones contenant de la neurotensine se trouvent dans le nucleus accumbens, les noyaux arqué et ventromédian de l'hypothalamus, le lit de la strie terminale, l'hippocampe, le caudé-putamen, le cortex frontal, le globus pallidus, le cortex piriforme, la substance noire et l'aire tegmentaire ventrale. Au niveau du tronc cérébral, le noyau du raphé magnus, la substance grise périaqueducale et le noyau du faisceau solitaire sont aussi des régions riches en NT. Plusieurs de ces régions sont en lien direct avec le rôle de la neurotensine dans les voies descendantes de la nociception. C'est le cas particulièrement pour le raphé magnus et la substance grise périaqueducale au niveau du tronc cérébral ou encore de l'amygdale dans le système limbique.

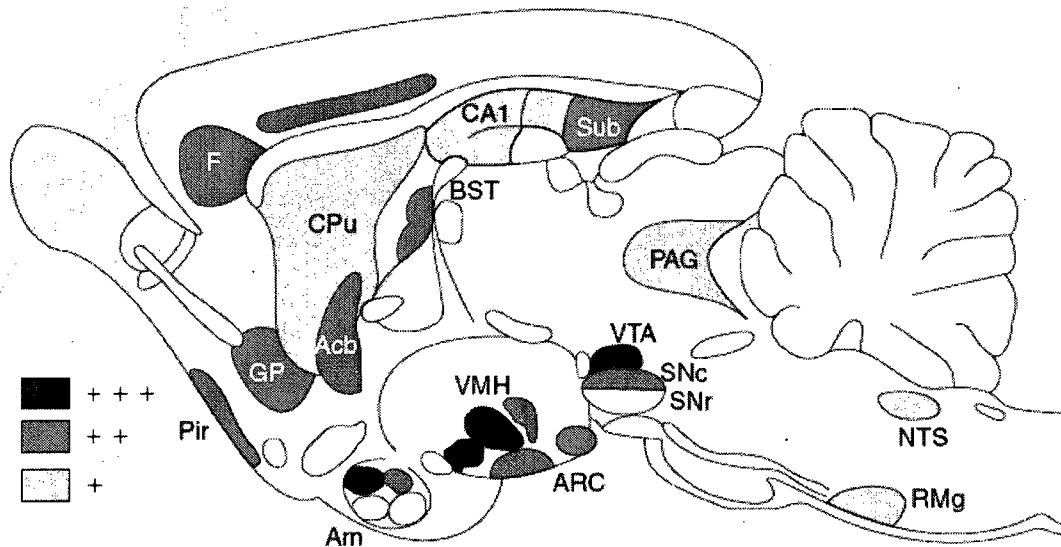


Figure 16. Localisation de la neurotensine dans le cerveau du rat. Acb : noyau accumbens; Am; noyau de l'amygdale; ARC : noyau arqué de l'hypothalamus; BST, noyau de la strie terminale; CA1 : Champ CA1 de la corne d'Ammon (Hippocampe); CPu; caudée putamen; F : cortex frontal; GP : globus pallidus; NTS; noyau du faisceau solitaire; PAG; substance grise périaqueducale; Pir : Cortex piriforme; RMg: raphe magnus; SSc : substance noire, pars compacta; SNr : substance noire, pars reticulata; Sub : subiculum; VMH : noyau ventromédian de l'hypothalamus; VTA : aire tegmentaire ventrale.

3.1.2 Moelle épinière

La NT se retrouve surtout dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (laminae I et II) (**figure 16**). De plus, une immunoréactivité de moindre intensité

pour la NT est observée dans les laminae plus profondes. Encore une fois, cela vient corréluer avec l'action analgésique de la neurotensine et de ses analogues au niveau spinal.

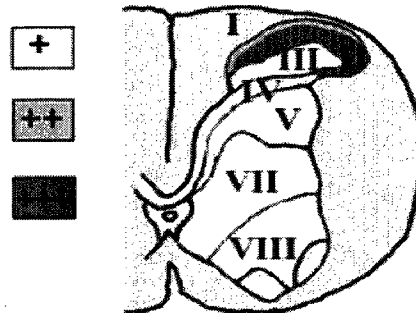


Figure 17. Localisation de la neurotensine dans la moelle épinière du rat. La NT se trouve principalement dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Rouge). Elle se retrouve aussi dans des laminae plus profondes (jaune) mais en moins forte concentration.

3.2 Récepteurs à la neurotensine

La neurotensine se lie majoritairement à trois récepteurs; NTS1, NTS2 et NTS3. Les deux premiers sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G qui possèdent une certaine homologie de séquence entre eux (64%) (VINCENT et al. , 1999). NTS3 appartient à une famille de récepteurs différents, les récepteurs membranaires de type 1, à un seul domaine transmembranaire. Chacun de ces récepteurs remplit une partie des fonctions physiologiques de la neurotensine. Les récepteurs NTS1 et NTS2 sont les seuls étudiés dans la présente étude puisqu'eux seuls jouent un rôle connu dans l'analgésie neurotensinergique.

3.2.1 NTS1

Le récepteur NTS1 est constitué de 424 acides aminés (47kDa) chez le rat pour seulement 418 chez l'Homme. Il est considéré comme le site de liaison à la neurotensine à haute affinité avec une constante de dissociation (K_d) de 0,1 à 0,3 nM. Il est localisé principalement au niveau des neurones contenant le peptide vasointestinal de l'hypothalamus, des neurones cholinergiques du proencéphale basal et des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentaire ventrale et de la substance noire. Dans la moelle épinière, NTS1 est observé dans les laminae 1 et 2 de la corne dorsale de la moelle épinière au niveau lombaire (ROUSSY et al. , 2008). Dans cette même étude, NTS1 est observé dans les petits et moyens neurones des DRGs. Cela corrobore bien avec ses fonctions dans l'analgésie produite par la neurotensine.

NTS1 possède des sites de liaison pour les protéines Gq, Gi/o et Gs (PELAPRAT. , 2006). Par contre, tous les systèmes utilisés pour l'étude de la signalisation induite par l'activation de NTS1 mènent aux mêmes événements, soient l'activation de la phospholipase C, la production d'inositol phosphate et la mobilisation du calcium intracellulaire. Cela laisse présager que le récepteur lie préférentiellement une Gq/11 (KITABGI. , 2002). Cependant, il a aussi été observé que l'activation de NTS1 pouvait inhiber l'adénylyl cyclase et augmenter la production d'acide arachidonique à travers une Gi/o dans des cellules transfectées (GAILLY et al. , 2000). Finalement, la NT stimule cette cyclase via une Gs dans certaines souches de cellules cancéreuses (ISHIZUKA et al. , 1993). Finalement, l'activation de la voie des MAP kinases ERK1/2 a été montré dans

des cellules cancéreuses pancréatiques (EHLERS et al. , 2000); (GUHA et al. , 2003). Cette dernière découverte pourrait aussi faire l'objet d'études en douleur puisque le rôle de ces facteurs de transcription a été démontré dans la douleur neuropathique (MA et QUIRION,R. , 2005). Par conséquent, en raison de sa distribution et de sa pluripotentialité au niveau signalétique, NTS1 est le récepteur pour la majorité des fonctions biologiques de la neurotensine, que ce soit au niveau central ou périphérique.

Suite à leur liaison avec leur ligand, la NT, 60% des récepteurs NTS1 sont internalisés de façon plutôt rapide. En effet, la moitié de l'effet d'internalisation est observée 10 minutes après la stimulation avec le ligand (CHABRY et al. , 1994, HERMANS et al. , 1994). La protéine est ensuite intégrée dans des endosomes pour être finalement dégradée.

3.2.2 NTS2

Le récepteur NTS2 est constitué de 416 acides aminés pour un poids moléculaire de 45 kDa. Il est aussi possible d'observer un variant de 5 domaines transmembranaires, suite à un épissage alternatif, qui ne fait que 281 acides aminés (PERRON et al. , 2005). Ce récepteur a aussi une forte affinité pour la neurotensine mais elle est toutefois dix fois moindre que celle de NTS1 (2 à 4 nM). C'est pour cela qu'on dit généralement que NTS2 est le site à faible affinité. NTS2 est très largement distribué partout dans le cerveau du rat adulte (SARRET et al. , 2003). La concentration de l'ARNm et des sites liant la levocabastine, un antihistaminique qui lie NTS2, est toutefois plus élevée dans le bulbe olfactif, le cortex cérébral et celui du cervelet, ainsi que l'hippocampe et certains

noyaux de l'hypothalamus (SARRET et KITABGI, sous presse). Au niveau du tronc cérébral, de fortes concentrations de NTS2 sont retrouvées dans des structures impliquées dans le contrôle de la douleur telles que la substance grise périaqueducale, le noyau raphé dorsal, le raphé magnus, les noyaux paragigantocellulaires, etc. Il est aussi abondant dans la moelle épinière au niveau de la corne dorsale et des ganglions de la racine dorsale (SARRET et al. , 2005). Ce qui renforce l'idée que NTS2 est impliqué dans les voies antinociceptives.

Les interactions qui se produisent entre NTS2 et les protéines G ne sont que très peu connues. En effet, certains indices observés dans l'ovocyte de xénope suggèrent un couplage avec Gq/11 (BOTTO et al. , 1997) mais ces caractéristiques n'ont pas été retrouvées dans d'autres systèmes cellulaires (BOTTO et al. , 1998). Les données suggérant une interaction avec Gi/o et G_{12/13} sont aussi contradictoires selon le système et le récepteur (humain, rat ou souris) étudié (PELAPRAT. , 2006). Ces différentes protéines G exercent des rôles distincts tels que l'activation de la phospholipase C (G_{q/11}), l'inhibition de la production d'AMPc (Gi) ou l'activation de l'IP3 et du diacylglycérol comme second messenger (G_{12/13}). Par contre, le récepteur NTS2 active la voie ERK1/2 lorsqu'il s'agit du récepteur du rat et de l'humain (GENDRON et al. , 2004). Cela fait en sorte qu'il subsiste beaucoup de mystère autour des voies de signalisation induites par NTS2.

Contrairement à NTS1, NTS2 n'est pas dégradé lorsqu'il est internalisé (30 à 40% des récepteurs sont internalisés suite à la liaison au ligand). Ce dernier est recyclé à la

membrane plasmique. Le processus de recyclage dépend de certains sites de phosphorylation situés dans la troisième boucle intracellulaire.

3.3 La neurotensine et l'analgésie

Les premières études montrant les effets analgésiques de la neurotensine ont été menées grâce à des injections intracisternales et intracérébroventriculaires chez le rat (CLINESCHMIDT et MCGUFFIN, J. C. , 1977, CLINESCHMIDT et al. , 1979). Ces études constituent aussi les premières évidences que les voies antinociceptives de la neurotensine sont différentes de celles employées par les opiacés. D'autres études viendront par la suite confirmer ce fait (MARTIN et al. , 2002, MARTIN et NARUSE, T. , 1982). En effet, une dose de neurotensine de l'ordre du nanomolaire (3-30nmol) dans le noyau du raphe magnus ou de la médulla rostro-ventrale provoque ainsi une inhibition de la réponse au test du retrait de la queue. Cependant, la neurotensine n'est pas strictement anti-nociceptive. En effet, une plus faible dose (30-300pmol) induit une hypersensibilité à ce même test (URBAN et SMITH, D. J. , 1993, SMITH et al. , 1997). Au niveau spinal, une injection intrathécale induit aussi une antinociception significative, cette fois en réponse à une injection sous-cutanée de saline hypertonique (HYLDEN et WILCOX, G. L. , 1983).

L'équipe de Kitabgi a ensuite voulu vérifier si le récepteur qui provoque l'analgésie induite par la NT est le même que celui impliqué dans ses autres fonctions? Ils ont alors montré l'existence d'un sous-type de récepteur de la NT différent de celui qui produit ses

autres rôles physiologiques (DUBUC et al. , 1994). En effet, l'utilisation du SR48692, un antagoniste non-peptidique connu pour enrayer les effets hypolocomoteurs de la NT, n'a pas eu d'effet sur l'antinociception induite par cette dernière. Cela laissait sous-entendre que la NT était toujours capable d'induire l'analgésie, mais via un autre récepteur. L'existence de ce second récepteur a été mise en évidence par la synthèse d'un analogue peptidique de la NT (JMV-431) qui produisait les effets hypothermiques et antinociceptifs sans pour autant activer la relâche de dopamine comme c'est le cas pour NTS1 (LABBE-JULLIE et al. , 1994). Ces observations se sont confirmées par la création d'un nouvel antagoniste, le SR142948A, qui n'est que partiellement remplacé par la lévocabastine. Une fois les sites NTS2 bloqués, on voit que le SR142948A bloque tous les sites restants, ne correspondant qu'à 50% des sites totaux. Cela prouve que la NT se lie à deux récepteurs différents dans le cerveau de rat (GULLY et al. , 1997). C'est donc ce site à plus faible affinité bloqué par la lévocabastine (un agoniste se liant préférentiellement à NTS2) et activé par le JMV-431, qui a d'abord été identifié comme le récepteur responsable des effets analgésiques de la NT (DUBUC et al. , 1999a).

Toutefois, l'antinociception neurotensinergique est bien plus complexe. En effet, il a rapidement été démontré que NTS1 pouvait aussi avoir un rôle à jouer dans l'analgésie induite par la NT. En effet, l'injection intra-péritonéale d'un complexe antisens peptide-ADN ciblant NTS1 a permis d'altérer l'effet analgésique d'une injection intracérébrale de NT (TYLER et al. , 1999). Par la suite, la production de souris invalidées pour le gène du récepteur NTS2 a soulevé des questions puisque le groupe de Pettibone a observé une réponse modifiée à la NT au test de la plaque chaude (PETTIBONE et al. , 2002) alors

qu'aucun effet n'a été observé en douleur viscérale par une seconde équipe de recherche (REMAURY et al. , 2002). De son côté l'équipe de Wada n'observe que très peu de modification dans la réponse basale chez les souris KO, que ce soit pour NTS1 ou NTS2 (MAENO et al. , 2004). Il n'en demeure pas moins que nous avons récemment démontré que les deux récepteurs jouent un rôle dans la modulation de la transmission de la douleur au niveau spinal (ROUSSY et al. , 2008, SARRET et al. , 2005).

BUT ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel des *Dicer substrate siRNA* dans l'invalidation du gène codant pour le récepteur NTS2 au niveau du système nerveux central chez le rat. Pour ce faire, nous avons injecté des DsiRNA sélectifs pour le récepteur NTS2 dans l'espace intrathécal de rats naïfs. Les objectifs spécifiques de l'études sont d'évaluer leur degré de pénétration dans les structures du SNC et d'en évaluer les effets sur :

1. La présence et l'abondance de l'ARN messager codant pour la protéine NTS2 dans les DRG et dans la moelle épinière au niveau lombaire
2. Le niveau d'expression de la protéine dans les structures étudiées.
3. L'effet analgésiques du JMV-431, un agoniste peptidique hautement sélectif pour le récepteur NTS2, suite au pré-traitement avec les DsiRNA.

Nous avons aussi, de façon préliminaire, évalué les possibles effets hors-cibles en évaluant l'état de la fonction d'une protéine proche sur le plan de la séquence, soit le récepteur NTS1. Finalement, nous avons commencé la caractérisation des effets immunostimulateurs éventuels des DsiRNA en examinant les variations d'expression de gènes reconnus comme étant signes d'inflammation tels que COX-2.

ARTICLE

**CENTRAL DELIVERY OF DICER-SUBSTRATE siRNA: A DIRECT APPLICATION
FOR PAIN RESEARCH**

Louis Doré-Savard¹, G. Roussy¹, M.A. Dansereau¹, M.A. Collingwood², K.A. Lennox², S.D. Rose², N. Beaudet¹, M.A. Behlke² and P. Sarret¹.

¹Dept. of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Univ. of Sherbrooke, Sherbrooke, PQ, Canada.

²Integrated DNA Technologies Inc, Coralville, Iowa, United States.

Article soumis le 18 décembre 2007 à *Molecular Therapy (Nature Publishing Group)*,
révisé le 10 avril 2008 et accepté pour publication le 15 avril 2008.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

L'interférence par l'ARN est maintenant acceptée pour son potentiel thérapeutique dans le traitement de maladie périphériques et plusieurs études cliniques sont en cours utilisant des siRNA standards de 21 nucléotides. Cependant, pour des pathologies centrales comme la douleur, ces composés sont limités mais n'en demeurent pas moins importants pour la poursuite de la recherche sur la douleur et sa prise en charge. Dans la présente étude, nous montrons l'invalidation efficace d'une cible protéique pertinente pour la recherche sur la douleur dans le système nerveux central à l'aide de Dicer-substrate siRNA de 27-mer. Une très faible dose de DsiRNA (0.005 mg/kg) est hautement efficace dans la réduction de l'expression du récepteur NTS2 dans la moelle épinière et les ganglions de la racine dorsale du rat lorsqu'injectée par voie intrathécale à l'aide d'un lipide cationique, le i-Fect. En plus de la diminution du contenu en ARNm et en protéine NTS2, nos résultats montrent une altération significative de l'effet analgésique d'un agoniste sélectif pour NTS2, atteignant jusqu'à 93% d'inhibition sur une période de 3-4 jours suivant l'administration des DsiRNA. Pour nous assurer que ces résultats ne sont pas biaisés par un effet hors-cible non désiré, nous avons montré que la même antinociception se produisait suite à l'administration d'un deuxième duplex visant NTS2, et que ceux-ci n'altèrent aucunement l'antinociception induite par le récepteur NTS1, un récepteur très proche au niveau de la séquence. En résumé, l'interférence avec les DsiRNA représente un outil efficace pour décortiquer les voies nociceptives et pourrait devenir une nouvelle classe d'agents thérapeutiques.

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) is gaining acceptance as a potential therapeutic for peripheral disease and several clinical trials are already underway with 21-mer small interfering RNA (siRNA) as active pharmaceutical agent. However, for central affliction like pain, such innovating therapies are limited but nevertheless crucial to improve pain research and management. We demonstrated here the proof of concept of 27-mer dicer-substrate siRNA (DsiRNA) in silencing targets related to central disorders such as pain states. Indeed, low dose DsiRNA (0.005 mg/kg) was highly efficient in reducing expression of the Neurotensin Receptor 2 (NTS2, a G-protein coupled receptor involved in ascending nociception) in rat spinal cord via intrathecal administration formulated with the cationic lipid i-Fect. Along with specific decrease of NTS2 mRNA and protein, our results show a significant alteration of the analgesic effect of a selective-NTS2 agonist, reaching 93% inhibition up to 3-4 days following DsiRNA administration. To ensure that findings were not biased by unsuspected off target effect, we also demonstrated that treatment with a second NTS2-specific DsiRNA also reversed NTS2-induced antinociception and that NTS2-specific 27-mer duplexes did not alter signaling through NTS1, a closely related receptor. Altogether, DsiRNA interference represents a potent tool for dissecting nociceptive pathways and could further lead to a new class of central active drugs.

INTRODUCTION

The use of synthetic double-stranded RNA (dsRNA) oligonucleotides to trigger RNA interference (RNAi) and specifically reduce expression of targeted genes is a standard research method routinely used *in vitro*. The ability to manipulate gene expression levels can help to elucidate the functions of gene products and facilitate the observation of subsequent phenotypic changes in a controlled experimental fashion 1, 2. RNAi is also gaining acceptance as a research tool *in vivo* and over a hundred publications already report use of this method in live animals 3, 4. In addition to elucidating gene function *in vivo*, it can be used to validate the potential significance of specific genes as targets for small molecule drug development programs 5. Over 30 biotechnology and pharmaceutical companies are actively pursuing RNAi-based therapeutics and several compounds are already in clinical trials. In spite of the rapid progress made for *in vivo* applications of RNAi, the field is still in its infancy; methods for use are neither routine nor standardized. Use of siRNA in the central nervous system (CNS) may be more complex than use in other organs, such as the liver. In general, the greatest challenges that exist for *in vivo* use of RNAi relate to delivery (especially with target organ or cell type specificity) and to limit the potential for undesired off-target effects (OTEs) 6.

Small interfering RNAs are the natural products of processing longer double-stranded RNAs (dsRNAs) by the endoribonuclease Dicer 7. Most researchers today employ synthetic RNA duplexes that are 21 bases long as experimental tools to trigger RNAi. These molecules mimic the natural siRNAs produced by Dicer processing. In 2005, several groups demonstrated that use of slightly longer synthetic RNAs, which are substrates for Dicer, can show increased potency over traditional 21mer siRNAs 8, 9.

These longer RNAs are processed by Dicer into 21mer siRNAs in a predictable fashion 10 and the increased potency seen using this approach is thought to arise from the participation of Dicer in RISC formation (**Figure 1**). Typically these reagents are synthetic RNA duplexes 27 bases in length and are referred to as Dicer-substrate siRNAs (DsiRNAs). An increasing number of reports have validated the performance of the Dicer-substrate reagents *in vitro*, however, given their relatively recent introduction, the number of reports showing *in vivo* activity are fewer in number 11, 12. Previous *in vivo* work demonstrated use of DsiRNAs formulated with cationic lipids delivered by intraperitoneal injection to target macrophages or use of naked DsiRNAs delivered by hydrodynamic intravenous injection (tail vein) to target hepatocytes. In this study, we employ DsiRNAs to target specific cells within the CNS.

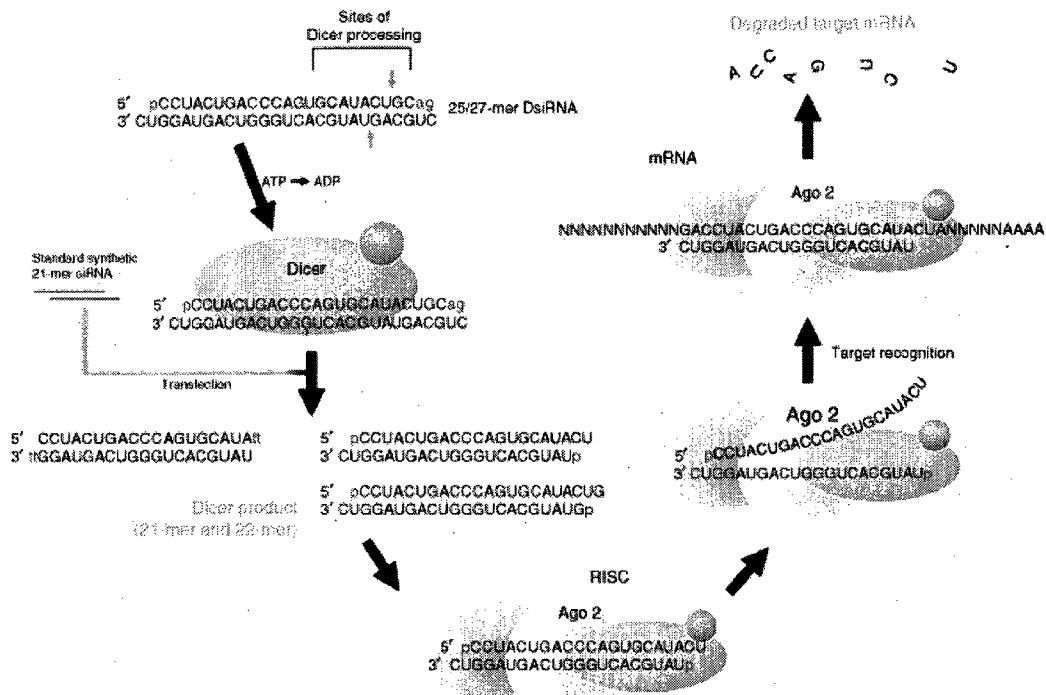


Figure 1. Mechanism of Dicer-substrate siRNA processing in mammalian systems. After cellular uptake, DsiRNAs are processed into 21-base siRNA and benefit from pre-association with the enzyme Dicer to facilitate loading into RISC. Asymmetric 27-mer duplexes are incorporated in the RNAi processing machinery one step earlier than classical 21-base siRNA. The asymmetric design with a single two base 3'-overhang on the antisense strand and DNA bases on the opposing blunt end provides Dicer with a substrate that cleaves in a predictable way. During RISC assembly, one the two siRNA strands, referred to as the passenger strand, is cleaved and released, whereas the other strand (guide strand) is incorporated into the argonaute protein Ago2 component of RISC. The remaining single-stranded siRNA then guides the RISC complex to its complementary target mRNA, which is finally cleaved by the endonucleolytical activity located in the Ago2 protein.

Systemic delivery of siRNAs *in vivo* to peripheral organs and tumors has been demonstrated in a variety of systems (for recent reviews, see 4, 13). Since siRNAs do not cross the blood-brain-barrier (BBB) 14, silencing of gene targets in the central nervous system (CNS) requires either use of a BBB permeable carrier or direct injection into brain parenchyma or cerebrospinal fluid (CSF). Continuous intrathecal infusion of naked siRNA has been shown to be effective, however very high doses are required 15, 16. Although toxic when injected intravenously, cationic lipids can be used *in vivo* to facilitate local delivery of nucleic acids. The cationic lipid i-Fect (Neuromics) was used by Luo and colleagues 17 to deliver siRNA via intrathecal (i.t.) injection to target delta opioid receptors in spinal cord. More recently, Kumar reported use of siRNA delivered by direct intracerebral injection with i-Fect to protect mice from lethal viral encephalitis 18 and Dong demonstrated the efficacy of intrathecal infusion of siRNA formulated in i-Fect to silence the sodium channel Nav1.8 in rat dorsal root ganglia (DRG) in nociception 19.

In the present study, we demonstrate the efficacy of 27mer DsiRNA to reduce expression of a specific G-protein coupled receptor (GPCR) gene in rat spinal cord and dorsal root ganglia (DRG). Low doses of DsiRNA formulated in i-Fect were administered by intrathecal injection and induced a sustained reduction of the *Neurotensin Receptor 2 (NTS2)* GPCR mRNA and protein levels for 3-4 days. Reduction of NTS2 resulted in the expected behavioural changes in nociception. Our results highlight the feasibility of using DsiRNA for pain research, while exhibiting no apparent toxicity or non-specific side effects during the study period.

MATERIAL AND METHODS

DsiRNA design

All chemical DsiRNA described in this study were synthesized and HPLC-purified by Integrated DNA Technologies. Compound identity was verified by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and compound purity was measured to be better than 90% by analytical HPLC. Sequences are provided in **Table S1** in the online supplemental materials.

In vitro DsiRNA transfection and quantitative Real-Time PCR.

The NTS2-stable CHO cell line was cultured in 24-wells plate in F12 medium supplemented with 10% FCS, 1% pen/strep and 0.25 mg/ml of G418 as a selection agent. Upon reaching 40-50% confluence, three separate wells were independently transfected with either test (0,1 nM or 10 nM) or control (10 nM) DsiRNA formulated with 1µl of RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 20 minutes prior to transfection. Controls included a mismatch DsiRNA, a functional DsiRNA targeting Lamin A/C, a Cal610 dual-labeled fluorescent DsiRNA to visualize uptake, the transfection reagent alone and untreated cells. After 24 hours of transfection, total RNA was extracted using the SV96 total RNA isolation system (Promega, Madison, WI, USA). Reverse-transcription was done on 150 ng of RNA with 200 U of SuperScript II (Invitrogen). Real-Time PCR was performed in triplicate for every cDNA sample on a Light Cycler 480 (Roche) using the Light Cycler 480 ® probes Master mix. NTS2 levels were analyzed by absolute quantification and normalized against ribosomal protein L23. The average normalized

NTS2 knockdown was then compared to control DsiRNA-treated cells. DNA oligonucleotides and probes used in Taqman assay are listed below. FAM is 6-carboxyfluorescein and IBFQ is Iowa Black dark quencher.

Name	Sequence
NM_022695	
NTS2-forward	5' CCCGATGATGGATGGACTAATG 3'
NTS2-reverse	5' AAGACACGGCGTTGTAGAG 3'
NTS2-probe	5' FAM-ACACGCTCTTCTATGTCAGCTCAGCAGT- IBFQ 3'
NM_001007599	
RPL23-forward	5' GGCGAGATGAAAGGTTCTGCTA 3'
RPL23-reverse	5' CACACTGGAGAATCAGGCAATG 3'
RPL23-probe	5' FAM-ACTTGTGGCCCAGGATTGCATCCAAT- IBFQ 3'

5'-RACE (rapid amplification and cloning of ends) identification of mRNA cut site

NTS2-stable CHO cells were cultured in F12 medium supplemented with 10% FCS, 1% pen/strep and 0.25 mg/ml of the selection agent G418 in a 6-well plate. Cells were transfected with 10 nM of a scrambled negative control or v2-5 anti-NTS2 DsiRNA complexed for 20 minutes with 5 µl of RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a final volume of 2.5 ml after reaching 40-50% confluence. Total RNA was extracted 24 hours post-transfection with RNA STAT-60 (Tel-Test, Friendswood, TX, USA). Two hundred ng of total RNA was ligated with 50 pmoles of the M.R.S. linker 5'-TGGAATrUrCrUrCrGrGrGrCrArCrCrArArGrGrU-3' (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) using 5U of T4 RNA ligase (EpiCentre, Madison, WI, USA) in the presence of 1 mM ATP and 30% DMSO. The linkered RNA was ethanol precipitated

and cDNA was prepared using a Rat NTS2 site-specific primer, Rev/GSP1 5'-TGAGTAGTGACTATGTACCAGGCC-3', with SuperScript III (Invitrogen) using a 55°C extension temperature. The cDNA was PCR amplified first with the linker-specific forward (5'-TGGAATTCTCGGGCACCAAG-3') and the Rat NTS2 Rev/GSP1 primers, and then a hemi-nested PCR was run with using the previous reaction product as template using the linker-specific forward primer and a new Rat NTS2 Rev/GSP2 primer (5'-CACTGGGCACCTTCATCACTA-3'). PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis and cloned into the pCR2.1 Topo TA vector (Invitrogen). DNA sequence was determined using an ABI 3130XL sequencing platform (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Animal model and in vivo DsiRNA administration

Adult male Sprague Dawley rats (200-250g; Charles River Laboratories, St. Constant, Quebec, Canada) were maintained on a 12h light/dark cycle with access to food and water *ad libitum*. Animal-related procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Care and Experimentation of the University of Sherbrooke and carried out according to the regulations of the Canadian Council on Animal Care. Rats were acclimatized 4 days to the animal facility and 2 days to manipulations prior to behavioral studies. Dicer-substrate small interfering RNAs were resuspended in 0.9% sterile saline and were diluted in the i-Fect transfection reagent (Neuromics Inc. Edina, Minnesota) at a ratio of 1:5. DsiRNAs (1 µg) or Texas Red labeled DsiRNA (1 or 5 µg) were formulated with iFect for 15 minutes and injected within the next 15 minutes. Ten µl of this

formulation were administered twice (t=0h, t=24h) in the intrathecal space between lumbar vertebrae L5-L6 of rats under 5% isoflurane anaesthesia.

In vivo detection of fluorescent DsiRNA

Adult Sprague-Dawley rats were deeply anesthetized with ketamine 87 mg/kg / xylazine 13 mg/kg administered intramuscularly (300 µl) and perfused transaortically with a freshly prepared solution of 4% PFA in 0.1 M Phosphate Buffer (PB), pH 7.4. Tissues were rapidly removed and cryoprotected in 0.1 M PB containing 30% sucrose until utilization. Spinal cords were sectioned transversely at 30 µm on a Leica SM2000R sliding microtome and DRGs were cut on a Leica CM1850 cryostat at 20 µm. The sections were mounted on SuperFrost Plus slides (VWR, ON, Canada) and fixed with Aqua Poly/Mount (PolyScience, Pennsylvania, USA). Labeled structures were analyzed by confocal microscopy using the Olympus fluoview FV1000 laser-scanning microscope equipped with an Olympus BX61 automated research microscope.

In vivo molecular analyses

For qRT-PCR analysis, spinal cord and lumbar DRG (L4 to L6) were extracted from rats 24 h after the last injection. Total RNA was extracted using RNeasy® Mini Kits (Qiagen). Reverse transcription of the samples was performed with QuantiTect® kits (Qiagen) using 500 ng of total RNA as template. qPCR reactions were processed on a Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Research) using the QuantiTect® Probe Master mix (Qiagen). Triplicates of each sample were amplified with NTS2 dual-labeled probe and normalized against the ribosomal protein L23. Data were analyzed using the relative

standard curve method on samples undergoing the same procedures. For Western blot analysis, spinal cord and lumbar DRG were extracted from rats 24 h after the last injection. Tissues were homogenized separately with a Polytron in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 5 mM EDTA containing 1% Triton X-100 and protease inhibitors (Bioshop, Burlington, ON, Canada), and centrifuged at 15 000 rpm for 30 minutes at 4°C. The proteins from the supernatant were subsequently denatured using Laemmli sample buffer (0.375 mM Tris base, pH 6.8, 12% w/v sodium dodecyl sulfate [SDS], 30% v/v glycerol, 20% v/v β -mercaptoethanol, 0.2% w/v bromophenol blue) and equal amounts of proteins (25 μ g) were resolved using 10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were then electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes for 1 h at room temperature (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada). A prestained Dual color molecular mass marker was used to standardize gel migration (Biorad). PVDF membranes were incubated 10 seconds in methanol and dried 30 minutes at room temperature to block nonspecific sites. Membranes were immunoblotted overnight at 4°C with the specific rabbit anti-NTS2 antibody 20. After washing with TBS-Tween 20 (0.1 %), blots were incubated for 1 h at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit antibody (1:10 000; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) in TBS-Tween 0.1 %. Proteins were visualized using an enhanced chemiluminescent detection kit (PerkinElmer, Boston, MA, USA). Values were normalized to β -actin done in parallel on the same samples.

Behavioral testing

The effect of NTS2 mRNA silencing on acute nociception was investigated using the tail-flick test. Thermal threshold latencies were determined 15, 25 and 35 minutes after drugs

or vehicle injection. Testing involved measuring the latencies (in seconds) for the rat to withdraw its tail from a bath maintained at 52°C. Six centimeters of the rat's tail were submerged in hot water and the latency to flick or curl the tail was recorded. Baseline responses (before drug administration) were typically 4 seconds and a cut-off was imposed at 15 seconds to avoid tissue damage. The mean latency at 25 min (peak effect) was used to determine the efficacy of the silencing. Tail-flick latencies were converted to percentage maximum possible effect (MPE) according to the formula: % MPE = [(test latency) – (baseline latency)] / [(cut-off) – (baseline latency)] x 100.

To evaluate the DsiRNA efficacy in the NTS2 knockdown, rats were injected intrathecally with 90 µg/kg of the NTS2-selective NT analog, JMV-431 diluted in 30 µl of saline 0,9%, once daily for 4 consecutive days starting 24h after the last DsiRNA injection. The effective dose of JMV-431 was chosen accordingly to our previous studies 21. Control animals were injected with the vehicle i-Fect and/or saline. A second set of experiments was aimed at establishing the effects of NTS2-DsiRNA on NTS1-mediated spinal antinociception. To this end, we used the tail-flick test to determine the analgesic effect of the NTS1-selective agonist PD149163 (30 µg/kg) in NTS2 DsiRNA-treated rats.

Statistical analysis

For every statistical analysis, normality was assessed using Kolmogorov-Smirnov's test, followed by one-way ANOVA with the Bonferroni post-hoc test. We considered a p value lower or equal to 5% as significant. Statistical analyses were performed using SPSS software version 11.0.

RESULTS

NTS2 is a G-protein coupled receptor (GPCR) expressed in spinal and supraspinal structures involved in pain processing 22. Stimulation of NTS2 results in analgesia. Evidences for its involvement in pain is based on the regulation of NTS2 expression in animal models of chronic pain and altered pain responses in knockout mice 23. Additional direct proof is provided by inhibition of neurotensin (NT)-induced analgesia by NTS2-specific antisense oligodeoxynucleotides using intracerebroventricular delivery 24 and is further supported by the recent report of spinal analgesic activity of the selective-NTS2 agonist, JMV-431 21. Since we have already established a role for NTS2 in nociceptive modulation, this target was chosen for DsiRNAs proof of concept in silencing targets related to CNS disorders such as pain states.

DsiRNA in vitro validation

We synthesized and characterized 6 DsiRNAs specific for the rat *NTS2* gene (NM_022695). These 6 DsiRNAs and an appropriate mismatch control (randomized RNA sequence not targeting any rat gene), were evaluated *in vitro* for their ability to specifically reduce NTS2 mRNA levels using a NTS2 stable CHO cell line. Cells were treated with varying doses of DsiRNA and the capacity of the latter to silence NTS2 was analyzed by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR). Three DsiRNAs tested, v1-1, v2-3 and v2-5 resulted in nearly complete inhibition of NTS2 expression at 10 nM and remained effective at very low dose (0.1 nM) (**Figure S1**, online supplemental materials). In addition to having high potency, duplex v1-1 has identical sequence between mouse and rat and potentially functions in both species (untested in mice).

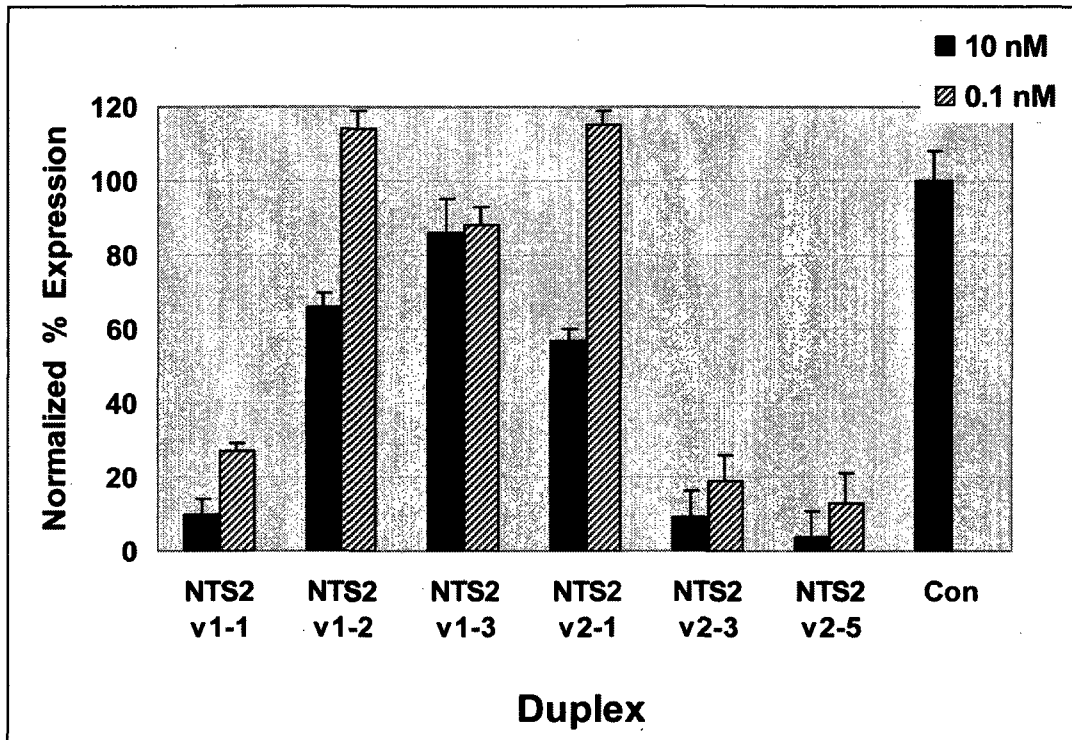


Figure S1

To confirm that dicing of DsiRNAs into the predicted 21-mer end-products occurs and that these are the active species loaded into RISC, 5' RACE-PCR was performed with the v2-5 anti-NTS2 DsiRNA transfected into NTS2-expressing CHO cells. Sequences of the transfected 27-mer DsiRNA and the predicted 21-mer siRNA product that should result from Dicer processing are shown in **Figure S2(a)** (Online Supplemental materials). The 5'-RACE procedure was performed using NTS2-specific primers and five clones containing amplified NTS2 cDNA were recovered, all of which contained exactly the same sequence (**Figure S2(b)**).

A. NTS2 DsiRNA v2-5

27mer

5' pCCUACUGACCCAGUGCAUACUGCag 3'
 3' CUGGAUGACUGGGUCACGUAUGACGUC 5'

21mer

5' pCCUACUGACCCAGUGCAUACU 3'
 3' CUGGAUGACUGGGUCACGUAUp 5'

B. NTS2 Sequence cloned by 5'-RACE

5' TCTCGGGCACCAAGGTCCAGTGCATACTGCAGGCAA 3'
 Cloning Linker NTS2 cDNA Sequence

C. NTS2 mRNA

↓

5' AGGUGGACCUACUGACCCAGUGCAUACUGCAGGCAA 3'
 :::
 27mer 3' CUGGAUGACUGGGUCACGUAUGACGUC 5'
 21mer 3' CUGGAUGACUGGGUCACGUAU 5'

The exact same internal cut site relative to the cloning linker was identified in all 5 clones. Alignment of the NTS2 mRNA sequence with the guide strands of the 27-mer and 21-mer species is shown in Figure S2(c), which clearly identified the cut site to lie between bases 10 and 11 relative to the 5'-end of the predicted 21-mer guide strand. We infer that Dicer processing of the 27-mer siRNA does occur in cells and that the resulting 21-mer species directs RISC cleavage of the NTS2 mRNA. Based on these previous

observations, two of these DsiRNA (v1-1 and v2-5) were employed in subsequent *in vivo* studies to reduce expression of NTS2 in rat spinal cord and DRG (Table S1, online supplemental materials).

Table S1: Sequences of DsiRNAs for NM_022695

Name	Sequence
NTS2 v1-1	5' pCCAACACGCUCUUCUAUGUCAGctc 3' 3' CUGGUUGUGCGAGAAGAUACAGUCGAG 5'
NTS2 v1-2	5' pCUCCCAGGUACCAUCAGCUUCUGcc 3' 3' AUGAGGGUCCAUGGUAGUCGAAGACGG 5'
NTS2 v1-3	5' pAGCCAUCGUGGCUGUGUAUGUCAtc 3' 3' UCUCGGUAGCACCGACACAUACAGUAG 5'
NTS2 v2-1	5' pCCACUAGUACGUACAGUUUCCGGct 3' 3' UUGGUGAUGCAUGCAUGUCAAAAGGCCGA 5'
NTS2 v2-3	5' pCAACAGAGUUGAAGAAUAGGAACcg 3' 3' UUGUUGUCUCAACUUCUUAUCCUUGGC 5'
NTS2 v2-5	5' pCCUACUGACCCAGUGCAUACUGCag 3' 3' CUGGAUGACUGGGUCACGUAUGACGUC 5'
Control	5' pCUUCCUCUCUUUCUCUCCCUUGUga 3' 3' AGGAAGGAGAGAAAGAGAGGGAACACU 5'

Effective uptake of DsiRNA by central nervous system tissues

Before examining whether administration of anti-NTS2 DsiRNAs altered the antinociceptive response mediated by NTS2 activation, we first evaluated if they were able to reach targeted tissues following intrathecal (i.t.) administration in a formulation with a cationic lipid. A control DsiRNA conjugated with Texas Red (1 μ g or 5 μ g injected twice at a 24 h interval; n = 3) was delivered i.t. at the rat lumbar spinal cord level in the cationic lipid transfection agent, i-Fect [18]. Spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) were recovered 24 h after the last injection. Laser scanning confocal microscopy revealed strong fluorescence signals in both lumbar DRG and spinal cord,

demonstrating effective uptake of DsiRNAs by intrathecal infusion (**Figure 2**). Within DRG, the fluorescence staining was present in the cell body of different sub-populations of dorsal root ganglia neurons, with no apparent difference between the two tested groups (**Figure 2A**). The fact that not all primary sensory neurons contained fluorescence and that the labeling intensity varied among the cells makes it unlikely that unspecific staining or diffusion are responsible for the observed distribution. At higher magnification, confocal images revealed that the fluorescence was confined to the cytoplasm of the cells and presented a diffuse cytoplasmic staining with added accumulation in what appear to be endosomal-like compartments (**Figure 2B**). Cellular uptake was also detected over the entire spinal cord cross sections, labeling both dorsal and ventral horn neurons (**Figure 2C**). Fluorescence was also detected in the neuronal cell processes, indicating that DsiRNAs were taken up and transported within spinal nociceptive structures (**Figure 2D**).

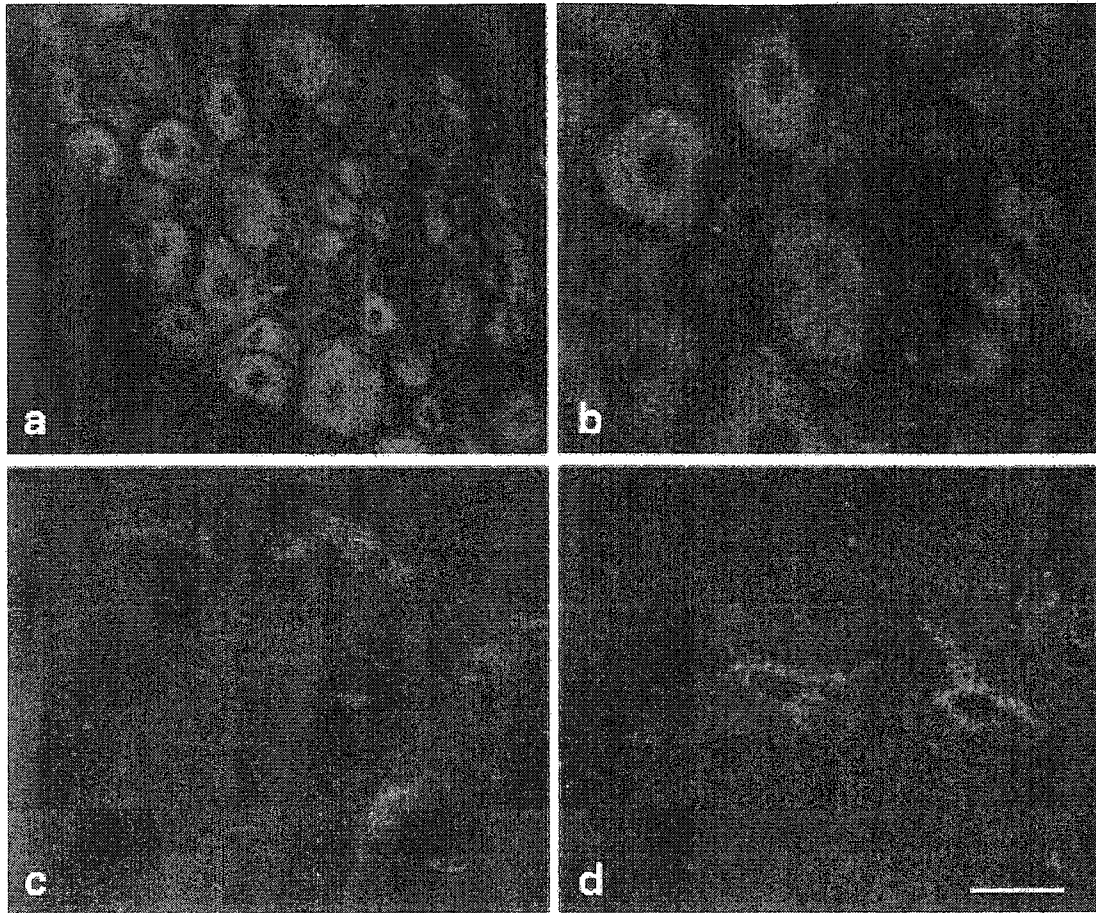


Figure 2. Cellular uptake of Texas Red-tagged DsiRNA by spinal nociceptive structures. (A, B) Distribution of fluorescence in lumbar DRG at 24 h after intrathecal injection of a control siRNA conjugated with Texas-Red (1 μ g administered twice at a 24 h interval; n = 3). As seen by confocal microscopy, the staining is not uniformly distributed among the cells. Higher magnification images also show that fluorescent signal is detected in the form of small intracytoplasmic hot spots sparing the nucleus. (C, D) Expression of Texas Red-tagged DsiRNA in dorsal spinal cord section taken from L5 segment. Fluorescence clusters are present in the cytoplasm of the cells. Note that the labeling is also detected in neuronal processes. Scale bar: 60 μ m in A, 30 μ m in B, 25 μ m in C and 15 μ m in D.

In vivo silencing of targeted gene expression by DsiRNA delivery

We assessed the effects of intrathecal administration of anti-NTS2 DsiRNAs (1 µg injected twice at a 24 h interval) on NTS2 mRNA and protein expression levels by using real-time qRT-PCR and Western blot analysis on DRG and spinal cord lysates. Compared to saline-treated rats and rats receiving the transfection reagent alone, a significant reduction of NTS2 mRNA was detected in the DRG and spinal dorsal horn at 24 h after the last DsiRNA dose (**Table 1**). Use of the anti-NTS2 v2-5 DsiRNA resulted in an 86% decrease of NTS2 transcripts in lumbar DRG compared to vehicle controls and 62% reduction in the spinal cord (n = 4). Similarly, use of the v1-1 anti-NTS2 DsiRNA resulted in reduction of NTS2 expression decreased by 52% and 70% in DRG and spinal cord, respectively (**Table 1**). Down-regulation of NTS2 was confirmed at the protein level by Western blot analysis (not shown).

Table 1

	Expression ratio NTS2/RPL23			
	Saline	i-Fect	DsiRNA v2-5	DsiRNA v1-1
Spinal cord	1.27 ± 0.14	0.99 ± 0.16 (22.2%)	0.49 ± 0.12 (61.6%)**	0.38 ± 0.13 (70.4%)**
DRG	0.92 ± 0.11	0.61 ± 0.35 (33.8%)	0.13 ± 0.05 (85.5%***)	0.44 ± 0.15 (51.9%)*

Abbreviations: DRG, dorsal root ganglia; DsiRNA, Dicer-substrate small-interfering RNA; NTS2, neurotensin receptor-2.

NTS2 mRNA level was measured in spinal cord and DRG by quantitative reverse-transcription PCR 24 hours after a 2 day pretreatment with DsiRNA v1-1, DsiRNA v2-5, vehicle (i-Fect) or saline. The data are analyzed with the relative standard curve method ($\Delta\Delta C_p$) and normalized against internal control gene *RPL23*. Each value corresponds to the mean \pm SEM of five biological samples done in triplicate and the knockdown percentage compared to the saline group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared to saline.

DsiRNA as a tool to modulate pain

To evaluate the efficacy of DsiRNA to silence endogenous NTS2 receptor analgesic effects, we introduced duplexes targeting NTS2, v1-1 and v2-5, into the CSF at the spinal level. Rats received an intrathecal bolus administration of 1 μ g DsiRNA, mismatch control or vehicle once daily for 2 consecutive days, and the nociceptive response was measured daily starting at 24 hours up to 4 days after the last DsiRNA injection by using the tail-flick test. In the vehicle-treated rats, repeated injections of the NTS2-selective agonist, JMV-431 (90 μ g/kg) elicited an antinociceptive effect over a 4-day period, characterized by an increase in tail flick response latencies compared to baseline values (producing up to 58% of the maximum possible effect (MPE; **Figure 3**). In contrast, i.t. injected JMV-431 showed no influence on the nociceptive threshold in DsiRNA v1-1-treated animals; silencing NTS2 reduced the analgesic effects of the JMV-431 by 93% (**Figure 3A**). The reversal of the JMV-431 response was no longer present on the fourth day after treatment, suggesting a return of functional NTS2 receptors. When using RNAi as a research tool, a simple strategy to enhance confidence that findings are not biased by unsuspected OTEs is to require that more than one DsiRNA against a given target produce the same biological results. Here, we demonstrated that the treatment with a second anti-NTS2 DsiRNA v2-5 also blocked JMV-431-induced analgesia (inhibiting by 99,5% the JMV-431 antinociception; **Figure 3B**). As observed with DsiRNA v1-1, the functional inhibition of NTS2 by DsiRNA v2-5 was transient and reversible since JMV-431 antinociception was not different when compared with that of vehicle-treated rats within three days after the last DsiRNA injection (**Figure 3B**). Another strategy to

ensure that results are not misleading due to cross-reactivity with genes having sequence homology is to verify that closely related receptors are not functionally affected. DsiRNA-treated rats were given intrathecal administration of a NTS1-selective agonist, PD149163. As expected, the analgesic efficacy of the NTS1-selective drug was not affected by anti-NTS2 DsiRNA treatment (not shown).

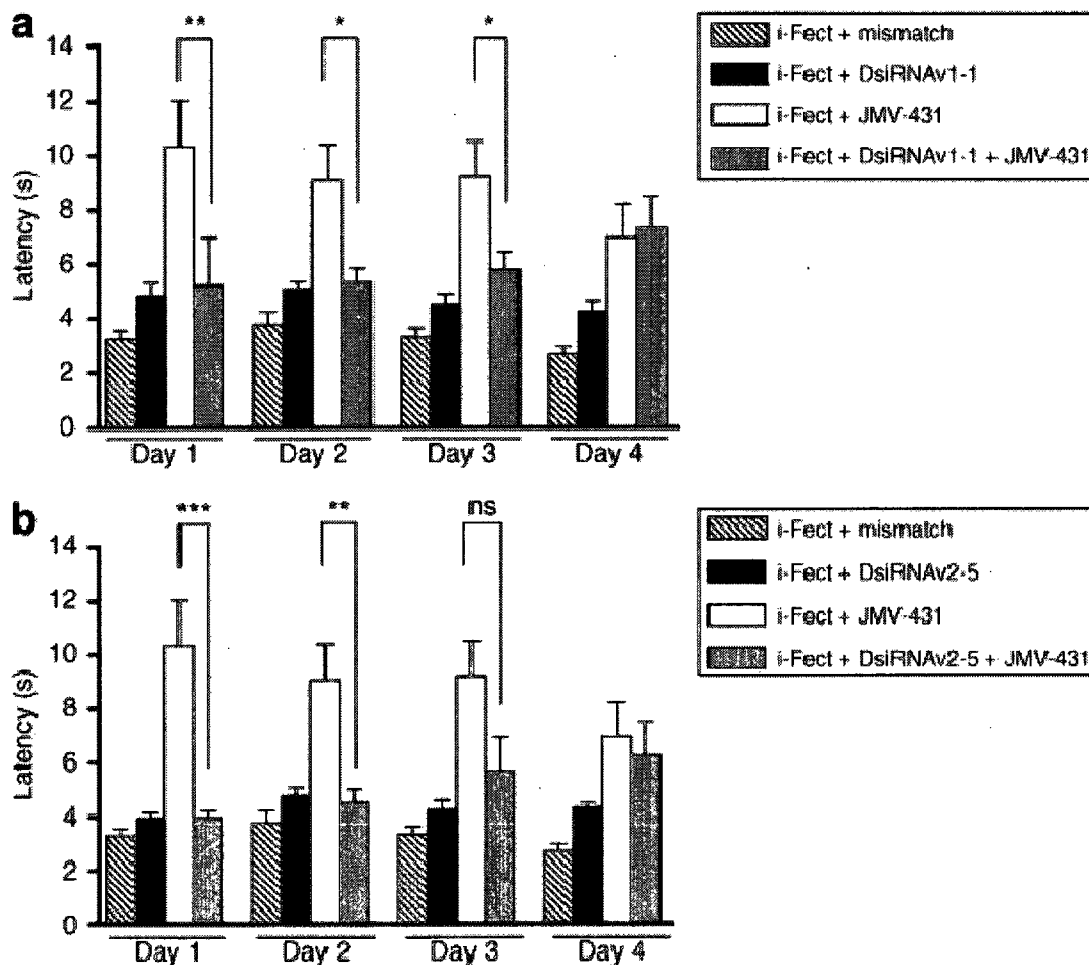


Figure 3. Knockdown of endogenous NTS2 receptors by DsiRNAs blocked spinal NTS2 agonist antinociception. The withdrawal latency is measured daily using the tail-flick test 24 h after the last DsiRNA (1 μ g per day for two consecutive days) or vehicle injection. (A) Pre-treatment with DsiRNA v1-1 completely reverses for 72 hrs JMV-431-induced antinociception, returning the latency of response to the baseline level of DsiRNA v1-1

pre-treated rats injected with saline. (B) Pre-treatment with the DsiRNA v2-5 also blocks the antinociceptive effect observed after administration of 90 µg/kg JMV-431, bringing the withdrawal latency back to the level of DsiRNA v2-5 pre-treated animals injected with saline up to the third day. Each data set represents mean ± S.E.M. of at least 6 animals. * : $p < 0,05$ ** : $p < 0.01$ *** : $p < 0.001$.

Analysis of the behavioral experiments after JMV-431 intrathecal injection showed no statistical difference between vehicle-treated rats and rats receiving a non-targeting control DsiRNA (Figure 4). The mismatch control DsiRNA did not interfere with JMV-431 analgesic activity. Additionally, the baseline response latency in the absence of the NTS2 agonist was similar in vehicle-treated rats, in rats receiving the control DsiRNA, as well as in DsiRNA v1-1- and DsiRNA v2-5-treated rats (Figure 4). Thus, *in vivo* silencing of NTS2 by the NTS2-specific DsiRNAs did not modify basal thermal nociception, which is consistent with previous reports 23, 24. No side effects, such as locomotion impairment, weight loss, discomfort or body temperature modification were observed. Rats behaved normally during the entire period of treatment with either DsiRNAs or NT receptor agonists. Although the DsiRNAs were delivered intrathecally, there were also no signs of spinal cord or DRG inflammation upon dissection and histological examination. Taken together, these results demonstrate that use of DsiRNA is a powerful tool for the modulation of nociceptive pathways and is safe, at least for short term administration.

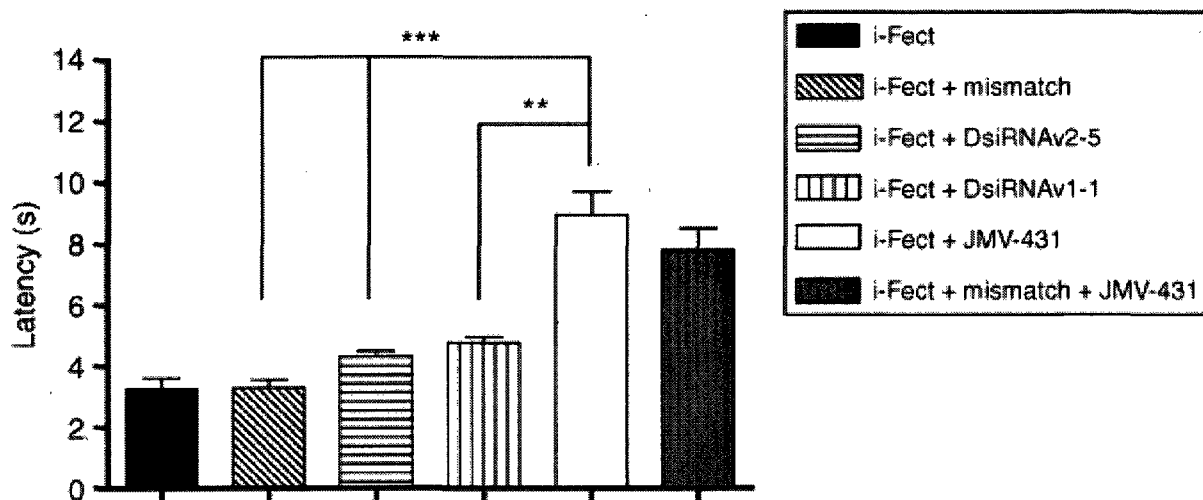


Figure 4. Basal nociceptive responses to thermal stimuli. Intrathecal injection of NTS2 DsiRNA v1-1 or DsiRNA v2-5 does not modify the tail withdrawal latency in the acute pain paradigm as compared to vehicle (i-Fect) or mismatch DsiRNA injection. Additionally, mismatch DsiRNA does not affect JMV-431-induced analgesia. Each data set represents the mean \pm S.E.M of at least 15 animals. ** : $p < 0,01$. *** : $p < 0,001$.

DISCUSSION

RNAi is an emerging technology in gene therapy and greatly broadens the set of molecular tools available for basic research *in vivo*. Although already considered to be a robust technology, improvements that increase efficiency at low doses are still desirable, particularly for *in vivo* applications. The present study demonstrates the potency of 27-mer DsiRNA to efficiently knockdown a GPCR in the central nervous system. Evolving pathologies, such as pain, often become drug resistant for a large subset of the population and there is a need for greater understanding of nociceptive mechanisms and also novel therapeutic approaches to support existing treatments. The Dicer-substrate siRNA method demonstrated here offers a potential new avenue to address this problem.

RNAi-based therapies present certain advantages in comparison to traditional pharmacological approaches. Nucleic acid hybridization is very specific and theoretically any desired gene could be uniquely targeted by an antisense or RNAi oligonucleotide of complementary sequence 25. Thus, any gene can be identified and uniquely silenced, even “non-druggable” targets inaccessible to small molecules pharmacopoeia 5. Over 30 pharmaceutical and biotechnology companies are conducting research in the area of RNAi therapeutics 4. Four “siRNA therapy” open studies, ranging from pre-clinical to phase III, are currently identified in the NIH/FDA supported registry of federally and privately supported clinical trials conducted in the United States and around the world 26. Much of this work is focused on peripheral pathologies such as hepatitis C, respiratory viruses, macular degeneration, HIV to name only a few examples 4.

There currently are no active or pending clinical trials involving RNAi therapy for indications in disorders of the central nervous system, although work in this area is ongoing. One of the problems underlying the delay in applying RNAi to CNS disease relates to poor siRNA delivery by bolus injection methods and the side effects from the microsurgical implantation of sustained delivery devices. A single dose is seldom useful to induce sustained silencing in the brain with stereotaxic injections or in the spine with intrathecal injections. A handful of studies based on central delivery were shown to induce functional silencing in the brain and in the spine, aiming at locomotion, pain and learning disorders 5. However successful, they reported a number of limitations to proceed to an effective and sustained knockdown using low siRNA concentrations 27; for example, some studies needed to employ dosing as high as 400 µg/day continuous infusion using an implanted osmotic pump 15. In 2005, Luo and colleagues 17 reported an effective intrathecal silencing using low dose administration of siRNA in a cationic lipid emulsion, but their method involved use of implanted i.t. catheters. For research applications, this method requires surgery, which lengthens the schedule of the experimenters and animals necessitate a recovery period ranging from 3 to 7 days. Also, surgical procedures and the introduction of foreign materials within the central nervous system can cause subsidiary neuropathic pain and phenotypic changes in the cells surrounding the site of lesion, which can confuse interpretation of results 28, 29. In a pain study, efforts are made to diminish the number of interventions to the animal to reduce stress and control any environmental parameter that could alter their responsiveness to noxious stimuli 30. Moreover, injection volumes are limited in the CNS due to the size of the targeted brain structures, to avoid adverse effects related to

volume increase 31 and redistribution of the agent to the basal cisterns of the brain 32. It is important to resuspend any drug administered in the CNS (in this case the RNA duplexes) in the smallest possible volume. Since many transfection reagents have a saturation limit above which precipitates occur, use of highly potent siRNAs will reduce the concentration needed to induce effective silencing and may be mandatory for successful application of this RNAi methodology for CNS targeting. In addition, by decreasing the siRNA concentration, adverse side effects are likely to also be reduced.

One class of off-target effect that can be caused by administration of synthetic RNAs is stimulation of the innate immune system 33. In our study we did not see any evidence for swelling or inflammation of the spinal cord by histological examination following low dose administration of DsiRNAs and did not observe evidence for any behavior abnormality in live animals during or after treatment. However, CSF was not tested for the presence of interferon or other inflammatory cytokines. Should concern for possible immune stimulation by treatment with double-stranded RNAs arise, use of duplexes with 2'-*O*-methyl modifications can prevent immune activation 34.

Homology searches are usually performed when designing siRNAs, so the likelihood of undesired cross-reactivity of a given siRNA with an unintended target through standard complementarity is low. However, another class of unwanted side effects can arise from the unintended interaction of the synthetic siRNA with endogenous cellular miRNA pathways, and in this case remarkably little homology is required to trigger a response 35. Homology screens have a more limited role in eliminating this class of off-target effect. Probably the best approach to reduce the possibility that a miRNA-related OTE contributes to a biological response elicited in an RNAi experiment

is observing the same results with two or more independent target-specific siRNAs 36. In the present study, nearly identical results were obtained using two DsiRNAs targeting different sites in the NTS2 transcript, arguing against OTEs contributing to the antinociceptive response, which resulted from treatment with anti-NTS2 reagents.

The carrier or delivery tool is a key component in any *in vivo* siRNA experiment. Contribution of the vehicle to the outcome of the experiment must also be considered. Viral delivery systems are often associated with safety and immunogenicity issues 37. Non-viral based transfection systems are thus more attractive to researchers and offer greater control of siRNA concentration and predictable toxicity patterns 38. Selection of a proper transfection agent that will efficiently protect and deliver DsiRNA to the tissues and offer an accurate release for further processing is crucial. Real potency of the injected reagent is defined by the efficiency of the delivery vehicle plus the intrinsic potency of the DsiRNA. High concentrations of dsRNA increase the risk of triggering an immune response, especially when used with cationic lipids, which maximize delivery of the nucleic acid to the endosomal compartments where Toll-like Receptors 3, 7, and 8 reside. High potency formulations will decrease the dose and number of injections required to functionally reduce levels of gene and protein expression and thereby minimize potential adverse effects. Cationic lipids are extensively used for siRNA uptake *in vitro* 16. Recently, a cationic lipid formulation, i-Fect, was found to deliver more efficiently siRNA into neuronal cells without toxicity while inducing equivalent effects *in vivo* than lentivirally delivered shRNA 18. Since this cationic lipid transfection reagent was also successfully used for intrathecal siRNA administration 17, 19, we selected the i-Fect lipid for use as our *in vivo* DsiRNA delivery vehicle.

In 2005, Kim and colleagues 9 demonstrated that 27-mer Dicer-substrate siRNAs could be more potent *in vitro* than standard 21-mer siRNAs. Introduction of a combination of asymmetric 3'-overhang and DNA bases at the opposing blunt end were shown to induce a more predictable dicing pattern and improve reliability of this method 10. This design also contributes to a greater stability towards nucleases, resulting in an extended half-life that could enable a longer silencing effect 39. Functional utility of 27-mer DsiRNAs *in vivo* were first demonstrated using intraperitoneal injection formulated with cationic lipids to target tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in peritoneal macrophages 11. DsiRNA have also been shown to work in a Hepatitis C model system using intravenous hydrodynamic injection to achieve delivery in liver 12. This report represents the first demonstration of function and potency of this class of RNAi reagent in the CNS, specifically targeting a GPCR receptor, NTS2, which is known to be involved in pain transmission 21. We first confirmed *in vitro* silencing efficacy of NTS2 DsiRNA by qRT-PCR. Moreover, the mechanism of action for suppression of the *NTS2* gene by our DsiRNA was investigated using 5'-RACE. Destruction of mRNA by RNAi begins with cleavage of the target mRNA by Ago2 at a site in the mRNA which is precisely defined by the siRNA. Cleavage occurs at the complementary position between bases 10 and 11 from the 5'-end of the guide strand 7. After initial cleavage by Ago2, the damaged mRNA is further degraded by action of additional 5'- and 3'-exonucleases. The Ago2-cut species is an unstable intermediate, which may be present in very low amounts. In spite of relatively low abundance, it is often possible to identify this species using 5'-RACE methods, and this approach has been used previously to demonstrate RNAi mechanism of action both *in vitro* and *in vivo* 40-42. We employed the 5'-RACE

procedure to both prove RNAi mechanism of action as well as demonstrate Dicer processing of the DsiRNA. If the 27-mer DsiRNA were to load intact into RISC without Dicer processing, the cut site should be located between bases 10 and 11 from the 5'-end of the 27-mer antisense strand, 6 bases away from the predicted cut site for the expected 21-mer siRNA product of Dicer processing. We observed that cleavage occurred precisely at the position predicted for Ago2-directed cleavage using the 21-mer siRNA Dicer cleavage product.

Further, we evaluated, *in vivo*, if DsiRNAs complexed with the cationic lipid agent were successfully delivered to both lumbar DRG and spinal cord. Our data indicate that lipid formulated-fluorescent RNAs administered i.t. were effectively taken up into both structures. We also found that the fluorescent signal was concentrated in neuronal processes, which is consistent with the localization of a Dicer complex in the dendritic domain of projection neurons, including dendritic spines and postsynaptic densities 43. It is also in line with the concept of local regulation of axonal mRNA translation via RNA interference 44. We next demonstrated specific suppression of NTS2 receptors, inducing a pronounced down regulation of both NTS2 mRNA and protein levels in both DRG and spinal cord. We had previously used antisense oligonucleotides to investigate the functional relevance of NTS2 for pain modulation and demonstrated the role of spinal NTS2 in pain transduction 21, 24. We similarly evaluated whether treatment with NTS2-specific DsiRNA changed the response to the NTS2 receptor agonist JMV-431 in an acute pain model. Following intrathecal delivery of NTS2 DsiRNA for 2 consecutive days in naïve rats, an injection of JMV-431 showed a complete loss of antinociceptive activity, as measured by a reduction in tail withdrawal thresholds, compared to vehicle-

and mismatch DsiRNA-treated rats. Note that intrathecal administration was done using the extremely low dose of 1 μ g (0.005 mg/kg), which resulted in gene silencing at a level sufficient to elicit an antinociceptive physiological effect for 3 days. To confirm that these observations are the result of a specific RNAi effect and are not related to some unsuspected off-target effect, we repeated the experiments using a second DsiRNA targeting a different site within the NTS2 mRNA. A similar reduction in NTS2 mRNA and protein was seen along with the physiological/behavior response showing blocked spinal JMV-431 analgesia. Sequence-dependent OTE are thus unlikely to be responsible for the agonist reversed antinociceptive activity. Due to its high specificity, DsiRNAs have also the potential for subtype selective silencing of even closely related genes. We did not find any evidence for interference with the related NTS1 pain signaling pathway when anti-NTS2-treated animals were injected with a NTS1-specific agonist. Finally, DsiRNA intrathecal administration did not elicit any behavioral changes or signs of neurotoxicity. Non-specific adverse effects in the spinal cord are presumably lesser because of rapid clearance of residual siRNA due to CSF recycling (50% renewed in 40-100 min) 45.

Pain is a major complaint for people who seek medical care and depend on chronic pharmacological treatment, and represents the largest market drugs for acting in the CNS today. Despite the obvious need for pain medication and the increasing progress made in the last few years in elucidating the molecular and cellular mechanisms underlying nociception, current pharmacotherapy of pain is mainly based on two classes of analgesic drugs, opioids 46 and non-steroidal anti-inflammatory drugs 47, 48. Unfortunately, these agents are sometime ineffective in the treatment of chronic pain and

have associated severe side effects including respiratory depression, constipation, nausea, peripheral organ toxicity 49, tolerance, and addiction 50. Thus, the development of new strategies for short- and long-term pain management is needed. Here, we demonstrated that intrathecal administration of DsiRNA is a suitable approach to investigate the relevance of potential pain targets in behavioral paradigms. Low concentrations were sufficient to induce a sustained and high level of target knockdown within the spinal cord and DRG without adverse effects. We also provided evidence that DsiRNA *in vivo* delivery represents a rapid and straightforward alternative to the generation of knockout animals for protein function assessments and pain target validation. The phenotype obtained after partial DsiRNA silencing is more equivalent to protein inhibition with conventional drugs than to the knockout situation, where total deletion of the gene of interest at the developmental stage has been shown to induce compensatory mechanisms. Transient inhibition of gene expression can thus be employed as a rapid method to investigate the functional role of potential targets, providing a proof of concept to justify the development of pharmacological molecules (target validation). DsiRNAs therefore represent a novel approach for tackling the challenge of pain in humans and may be suitable for development as a new class of CNS-active drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This work is supported by a grant MOP-74618 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) awarded to P.S. Authors are grateful to Dr. Jean Martinez for providing the NT compound. M.A.D. holds a studentship from CIHR and P.S. is a CIHR new investigator, member of the FRSQ-funded Centre de Recherche Clinique Étienne-Lebel. We are thankful to A. Lajeunesse and C. Audet for their support in graphic designing.

Conflict of Interest Statement:

MAB, MAC, KAL, and SDR are employed by Integrated DNA Technologies, Inc., (IDT) which offers oligonucleotides for sale similar to some of the compounds described in this manuscript. IDT is, however, not a publicly traded company and the authors personally do not own any shares/equity in IDT.

References

1. Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; **418**(6894): 244.
2. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *MicrobiolMolBiolRev* 2003; **67**(4): 657.
3. Whelan J. First clinical data on RNAi. *Drug DiscovToday* 2005; **10**(15): 1014.
4. Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs. *MolTher* 2006; **13**(4): 644.
5. Sah DW. Therapeutic potential of RNA interference for neurological disorders. *Life Sci* 2006; **79**(19): 1773.
6. Kim JY, Choung S, Lee EJ, Kim YJ, Choi YC. Immune Activation by siRNA/Liposome Complexes in Mice Is Sequence- independent: Lack of a Role for Toll-like Receptor 3 Signaling. *MolCells* 2007; **24**(2): 247.
7. Elbashir SM, 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**(6836): 494.
8. Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ *et al.* Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *NatBiotechnol* 2005; **23**(2): 227.
9. Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *NatBiotechnol* 2005; **23**(2): 222.
10. Rose SD, Kim DH, Amarzguioui M, Heidel JD, Collingwood MA, Davis ME *et al.* Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**(13): 4140.
11. Amarzguioui M, Lundberg P, Cantin E, Hagstrom J, Behlke MA, Rossi JJ. Rational design and in vitro and in vivo delivery of Dicer substrate siRNA. *NatProtoc* 2006; **1**(2): 508.
12. Kim M, Shin D, Kim SI, Park M. Inhibition of hepatitis C virus gene expression by small interfering RNAs using a tri-cistronic full-length viral replicon and a transient mouse model. *Virus Res* 2006; **122**(1-2): 1.
13. Aigner A. Delivery Systems for the Direct Application of siRNAs to Induce RNA Interference (RNAi) In Vivo. *JBiomedBiotechnol* 2006; **2006**(4): 71659.

14. Pardridge WM. Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. *Neuron* 2002; **36**(4): 555.
15. Dorn G, Patel S, Wotherspoon G, Hemmings-Mieszczak M, Barclay J, Natt FJ *et al.* siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**(5): e49.
16. Altier C, Dale CS, Kisilevsky AE, Chapman K, Castiglioni AJ, Matthews EA *et al.* Differential role of N-type calcium channel splice isoforms in pain. *JNeurosci* 2007; **27**(24): 6363.
17. Luo MC, Zhang DQ, Ma SW, Huang YY, Shuster SJ, Porreca F *et al.* An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. *MolPain* 2005; **1**: 29.
18. Kumar P, Lee SK, Shankar P, Manjunath N. A single siRNA suppresses fatal encephalitis induced by two different flaviviruses. *PLoS Med* 2006; **3**(4): e96.
19. Dong XW, Goregoaker S, Engler H, Zhou X, Mark L, Crona J *et al.* Small interfering RNA-mediated selective knockdown of Na(V)1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channel reverses mechanical allodynia in neuropathic rats. *Neuroscience* 2007; **146**(2): 812.
20. Sarret P, Perron A, Stroh T, Beaudet A. Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 2003; **461**(4): 520-538.
21. Sarret P, Esdaile MJ, Perron A, Martinez J, Stroh T, Beaudet A. Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 neurotensin receptors. *JNeurosci* 2005; **25**(36): 8188.
22. Dobner PR. Neurotensin and pain modulation. *Peptides* 2006; **27**(10): 2405-2414.
23. Maeno H, Yamada K, Santo-Yamada Y, Aoki K, Sun YJ, Sato E *et al.* Comparison of mice deficient in the high- or low-affinity neurotensin receptors, Ntsr1 or Ntsr2, reveals a novel function for Ntsr2 in thermal nociception. *Brain Res* 2004; **998**(1): 122-129.
24. Dubuc I, Remande S, Costentin J. The partial agonist properties of levocabastine in neurotensin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 1999; **381**(1): 9-12.
25. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *AdvDrug DelivRev* 2007; **59**(2-3): 75.
26. ClinicalTrials.gov. Information on Clinical Trials and Human Research Studies. Available at: www.ClinicalTrials.gov.

27. Hoyer D, Thakker DR, Natt F, Maier R, Huesken D, Muller M *et al.* Global down-regulation of gene expression in the brain using RNA interference, with emphasis on monoamine transporters and GPCRs: implications for target characterization in psychiatric and neurological disorders. *JReceptSignal TransductRes* 2006; **26**(5-6): 527.
28. Almeida FR, Schivo IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Chronic intrathecal cannulation enhances nociceptive responses in rats. *BrazJMedBiolRes* 2000; **33**(8): 949.
29. DeLeo JA, Colburn RW, Rickman AJ, Yeager MP. Intrathecal catheterization alone induces neuroimmune activation in the rat. *EurJPain* 1997; **1**(2): 115.
30. Sawynok J, Liu XJ. The Formalin Test: Characteristics and Usefulness of the Model. *Reviews in Analgesia* 2003; **7**: 145-163.
31. Gill JB, Heavner JE. Visual impairment following epidural fluid injections and epiduroscopy: a review. *Pain Med* 2005; **6**(5): 367.
32. Fairbanks CA. Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia. *AdvDrug DelivRev* 2003; **55**(8): 1007.
33. Marques JT, Williams BR. Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *NatBiotechnol* 2005; **23**(11): 1399.
34. Robbins M, Judge A, Liang L, McClintock K, Yaworski E, MacLachlan I. 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *MolTher* 2007; **15**(9): 1663.
35. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L *et al.* Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *Rna* 2006; **12**(7): 1179.
36. Echeverri CJ, Beachy PA, Baum B, Boutros M, Buchholz F, Chanda SK *et al.* Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *NatMethods* 2006; **3**(10): 777.
37. Cotter MJ, Muruve DA. The induction of inflammation by adenovirus vectors used for gene therapy. *FrontBiosci* 2005; **10**: 1098.
38. Andersen MO, Howard KA, Paludan SR, Besenbacher F, Kjems J. Delivery of siRNA from lyophilized polymeric surfaces. *Biomaterials* 2008; **29**(4): 506.
39. Kubo T, Zhelev Z, Ohba H, Bakalova R. Modified 27-nt dsRNAs with Dramatically Enhanced Stability in Serum and Long-Term RNAi Activity. 2007.

40. Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 2002; **297**(5589): 2053-2056.
41. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M *et al*. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; **432**(7014): 173-178.
42. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004; **304**(5670): 594-596.
43. Lugli G, Larson J, Martone ME, Jones Y, Smalheiser NR. Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *JNeurochem* 2005; **94**(4): 896.
44. Murashov AK, Chintalgattu V, Islamov RR, Lever TE, Pak ES, Sierpinski PL *et al*. RNAi pathway is functional in peripheral nerve axons. *Faseb J* 2007; **21**(3): 656.
45. Abbott NJ. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *NeurochemInt* 2004; **45**(4): 545.
46. Reid MC, Engles-Horton LL, Weber MB, Kerns RD, Rogers EL, O'Connor PG. Use of opioid medications for chronic noncancer pain syndromes in primary care. *JGenInternMed* 2002; **17**(3): 173.
47. Laine L. Approaches to nonsteroidal anti-inflammatory drug use in the high-risk patient. *Gastroenterology* 2001; **120**(3): 594.
48. Ong CK, Lirk P, Tan CH, Seymour RA. An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *ClinMedRes* 2007; **5**(1): 19.
49. Nicholson B. Responsible prescribing of opioids for the management of chronic pain. *Drugs* 2003; **63**(1): 17.
50. Nicholson B, Passik SD. Management of chronic noncancer pain in the primary care setting. *SouthMedJ* 2007; **100**(10): 1028.

DISCUSSION

Dans le développement de nouveaux médicaments, les chercheurs utilisent habituellement des peptides, des hormones, des anticorps ou encore des composés non-peptidiques pour inhiber ou encore activer un récepteur, une voie de signalisation ou une cellule. Depuis peu, les siRNA représentent un secteur de développement en plein essor pour les biologistes moléculaires et les physiologistes dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces molécules d'ARN sont dessinées pour lier spécifiquement l'ARN messager d'un gène ciblé via le complexe enzymatique RISC. Une fois le transcrit lié à ce brin d'ARN interférent, il est dégradé et la traduction n'a pas lieu. Certaines études *in vivo* démontrent déjà l'efficacité des siRNA dans l'invalidation d'une cible ainsi que ses effets dans le traitement de la pathologie à l'étude. Cependant, plusieurs obstacles restent à surmonter en rapport avec les doses utilisés, les effets non-spécifiques indésirables, les voies d'administration et l'acheminement vers la cible. Ces deux derniers points sont particulièrement vrais pour le système nerveux central puisque les siRNA ne passent pas la barrière hémato-encéphalique. Dans le cadre de leurs efforts pour répondre à ces problématiques, la compagnie Integrated DNA Technologies a développé les *Dicer substrate siRNA* (DsiRNA). Ces composés de 27 nucléotides sont, à la lumière des études *in vitro* effectuées, plus efficaces que les siRNA conventionnels car plus puissants dans l'inhibition de la cible et ce à plus faible dose (KIM et al. , 2005).

Au cours de cette étude, nous avons pour la première fois utilisé des DsiRNA au niveau du système nerveux central d'un animal; le rat. Nous avons procédé à des injections

répétées au niveau intrathécal afin d'inhiber l'expression du récepteur NTS2 de la neurotensine, un récepteur bien connu pour son rôle dans l'analgésie induite par la NT (SARRET et al. , 2005, DUBUC et al. , 1994, LABBE-JULLIE et al. , 1994, DUBUC et al. , 1999b, DUBUC et al. , 1999c). Nous avons également pu vérifier la pénétration des DsiRNA dans les cellules de la moelle épinière et des ganglions de la racine dorsale, régions exprimant le récepteur NTS2 (SARRET et al. , 2005). Suite à l'injection des DsiRNA, nous avons constaté la diminution de la présence de l'ARN messager codant pour NTS2. Les effets de ces DsiRNA ont été quantifiés par des analyses comportementales de l'effet analgésique de l'agoniste sélectif JMV-431. Nous avons pu observer que le JMV-431 perdait complètement son effet analgésique chez les rats ayant reçu deux injections de 1µg de DsiRNA à 24 et 48 heures avant le début des tests. Cet effet de l'inhibition de l'expression de NTS2 est visible pendant au moins 3 jours sans réinjection de DsiRNA. La spécificité de l'action du duplex utilisé a été vérifiée par l'utilisation d'un second duplex NTS2 ciblant une séquence différente du même gène, produisant le même effet.

Cette étude consiste donc en la validation de l'utilisation des DsiRNA comme moyen d'inhiber l'expression d'une protéine dans le système nerveux central et ce à très faible dose. Elle supporte l'idée que des études plus poussées sur le potentiel thérapeutique des DsiRNA dans le traitement de pathologies bien ciblées telles que la douleur chronique pourraient être entreprises.

1. Validation des duplex *In vitro*

La structure et la séquence des DsiRNA utilisés dans cette étude ont été déterminées selon les critères établis lors d'études précédentes (ROSE et al. , 2005, AMARZGUIOUI et al. , 2006). Leur capacité à inhiber l'expression du récepteur NTS2 a ensuite été évaluée dans des cellules *Chinese Hamster Ovary* (CHO). Ces cellules transformées expriment de façon stable le récepteur NTS2. Évidemment, le simple fait d'avoir une séquence théoriquement valide pour l'inhibition de l'expression d'un gène et fonctionnelle dans un système cellulaire n'est pas garant de son efficacité dans un système animal. Suite à ces expériences, nous avons constaté que certains des DsiRNA donnaient des résultats très prometteurs *in vitro* mais étaient très peu ou pas actifs *in vivo* (voir **Annexe 1**). Une des premières raisons pouvant engendrer des différences entre l'action sur des cellules immortalisées et un animal entier réside dans la qualité de la transfection. En effet, il est plus facile d'effectuer une transfection efficace sur des cellules en culture en monocouche que dans un organe entier. En effet, des méninges et des jonctions intercellulaires freinent la diffusion des substances pharmacologiques. Malgré un bon outil de transfection, l'efficacité de celle-ci ne peut être la même dans un système aussi complexe que la moelle épinière ou les DRGs. De plus, le transfectant utilisé par IDT pour transfecter les cellules CHO n'est pas le même que nous avons utilisé chez les rats. En effet, l'équipe d'IDT utilise un transfectant commercial de la compagnie Invitrogen, la Lipofectamine RNAiMAX. Cette formulation s'est avérée la plus efficace dans les cellules CHO. Il s'agit de la même formulation que la Lipofectamine 2000 déjà disponible depuis plusieurs années pour la transformation avec des plasmides d'ADN.

Selon la compagnie, la version RNAiMAX aurait été optimisée pour la transfection de siRNA (Invitrogen.com). Il s'agit donc d'un mélange de lipides cationiques tout comme l'est le i-Fect. Il est possible que des différences dans la composition de ces mélanges fassent en sorte qu'ils peuvent difficilement être comparés dans leur efficacité à acheminer un duplex dans les cellules en culture ou dans le système nerveux central. Il est évident que l'utilisation du même transfectant dans les deux systèmes (cellulaire et animal) nous permettrait d'établir avec plus de confiance si le duplex a un bon potentiel ou non. Néanmoins, des observations en microscopie confocale nous permettent de dire que les DsiRNA contrôles fluorescents ont pénétré les cellules nerveuses et se sont retrouvés dans les endosomes. La relâche efficace au niveau du cytoplasme n'a pu être confirmée mais l'hypothèse que cette relâche ait lieu est appuyée par l'efficacité de l'inhibition induite par les DsiRNA. Cette dernière étape est elle aussi limitante dans l'efficacité de l'interférence.

Le transfectant n'est certainement pas le seul facteur impliqué dans l'efficacité du duplex *in vivo*. Notre hypothèse est que certains duplex sont correctement pris en charge par Dicer dans les cellules CHO alors qu'ils seraient peu ou pas clivés une fois dans la moelle ou dans les ganglions de rat. Aucune donnée en ce sens n'a été publiée jusqu'à maintenant, mais des différences mécanistiques dans la machinerie Dicer/RISC pourrait survenir entre les systèmes cellulaires. De plus, ces différences pourraient se manifester lorsqu'on passe *in vitro* à un modèle *in vivo*. Il est possible de déterminer si le clivage par Dicer a bel et bien eu lieu à l'intérieur des cellules. Cette technique, appelée 5'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*), consiste à amplifier spécifiquement l'extrémité 5' d'une

séquence d'ARN en y attachant une séquence connue servant à l'appariement des amorces. Suite au séquençage de l'ADN complémentaire amplifié, il est possible de déterminer si le site de clivage anticipé est bien à la bonne position, c'est-à-dire au niveau des nucléotides 10 et 11. Ces expériences nous ont permis de démontrer que le clivage par Dicer avait bien lieu et que la séquence de 21 nt était bien présente dans les cellules CHO après la transfection avec les DsiRNA. Nous avons réalisé ces expériences en utilisant les duplex fonctionnels (v1-1 et v2-5) *in vivo* mais pas avec celui ne pouvant inhiber NTS2 (v2-3). Cela aurait pu nous permettre d'éliminer ce candidat et pourrait en fait constituer un contrôle de routine avant de passer à des expériences plus coûteuses. Cette technique ne s'applique pas encore aux expériences *in vivo* et les tentatives que nous avons menées sur des extraits de tissus nerveux de rats traités aux DsiRNA n'ont pas donné de résultats convaincants. Dicer doit couper les DsiRNA au bon endroit et si l'espèce de 21 nt est préservée assez longtemps de la dégradation dans l'organisme pour exercer ses effets. Il pourrait être nécessaire d'utiliser des inhibiteurs de nucléases afin de préserver les DsiRNA clivés de la dégradation. Plusieurs composés commerciaux disponibles mais conçus pour les expériences *in vitro*. Lors de la validation *in vitro*, nous avons utilisé une α -nucléase, XRN1, qui retarde la dégradation et permet d'isoler le produit de clivage pour son identification. D'autres produits tels que le siRNA-Intact (Neuromics) peuvent être utilisés mais aucun n'a été testé *in vivo*. La mise au point d'expériences utilisant ces inhibiteurs pourraient être la source d'un autre projet de recherche où ils seraient coadministrés par voie intrathécale ou encore sous forme de pré-traitement. Ils permettraient de prolonger la vie des DsiRNA dans l'organisme et nous serions en mesure de prouver que le clivage par Dicer *in vivo* est effectif. Les produits de

clivage pourraient aussi être visualisés en spectrométrie de masse que cela a été fait précédemment (ROSE et al. , 2005), mais les DsiRNA sont maintenant construits de manière à ce que l'on connaisse d'avance les produits. Par conséquent, ces contrôles se révéleraient coûteux et peu utiles.

2. Les DsiRNA, plus efficaces à faible dose que les siRNA conventionnels?

Les deux principaux critères sur lesquels se basent l'étude de l'équipe de Rossi pour évaluer l'efficacité des DsiRNA *in vitro* sont la concentration et son habilité à inhiber convenablement l'expression de la protéine cible. Dans le cadre de leur étude, des concentrations de 50pM sont suffisantes pour causer une inhibition allant jusqu'à approximativement 95%. Si on compare ces résultats avec ceux obtenus avec des siRNA standards, où une inhibition de 70 % requiert une concentration de 50nM, on voit qu'il s'agit d'un progrès d'un facteur 1000 (KIM et al. , 2005). Ces deux critères ont été remplis dans les études *in vitro* menées par IDT avec nos duplex ciblant NTS2. Avec des résultats d'inhibition de plus de 90% à des concentrations de 10nM, il nous était permis d'espérer que dans le cadre de nos expériences, il serait possible de conserver ces faibles doses et ainsi éviter les effets secondaires. C'est ainsi qu'avec une dose de 62,5 picomoles/animal par injection, nous avons atteint des inhibitions de l'ordre de 95% au niveau fonctionnel. Cette quantité de DsiRNA correspond à 1µg par injection et représente une concentration de 250nM dans le liquide céphalo-rachidien du rat (250µl). Par contre au niveau moléculaire, les taux d'inhibition varient de 52 à 86%. Cette efficacité réduite au niveau du système nerveux central est due au fait que les DsiRNA

sont injectés dans le liquide céphalo-rachidien avant de pénétrer les cellules nerveuses. Ce fluide fait l'objet d'un renouvellement constant et dissémine les substances vers des sites éloignés de celui où l'injection a été effectuée. Nous croyons qu'une partie des DsiRNA injectés est ainsi perdue et ne peut pénétrer les cellules au site d'injection.

Encore une fois, lorsqu'on compare nos résultats et qu'on considère les quantités utilisées, on voit que les DsiRNA induisent le niveau le plus élevé d'inhibition au niveau intrathécal rencontré avec une quantité aussi faible de siRNA (DORN et al. , 2004, ALTIER et al. , 2007, DONG et al. , 2007, LUO et al. , 2005). D'autres groupes de recherche menant des expériences sur le système nerveux central ont utilisé des concentrations moindres. Par contre, les siRNA étaient administrés localement en micro-injection directement dans la région visée et non dans le liquide céphalo-rachidien environnant (MAKIMURA et al. , 2002).

En comparaison avec les shRNA (SIOLAS et al. , 2005), il est très difficile d'établir un barème dose vs efficacité de la transcription du plasmide transporté par le virus ayant lieu dans le tissu injecté. Une étude comparative serait nécessaire afin de savoir si une méthode est plus efficace que l'autre, mais cela ne règlera pas le problème de la dose. L'utilisation des virus en expérimentation est aussi plus fastidieuse en raison du niveau de sécurité nécessaire à leur manipulation. En effet, il subsiste beaucoup d'inquiétude quant à l'utilisation de virus infectant l'homme à des fins thérapeutiques. Des expériences

récentes ont aussi montré que l'utilisation des virus AAV8 pouvait mener à de la neurotoxicité (KLEIN et al. , 2006).

3. Quantification de l'expression du gène NTS2

Différentes techniques peuvent être utilisées pour démontrer que la production de NTS2 a diminué dans un tissu ou dans la cellule. La technique de PCR quantitative en temps réel nous permet de montrer les changements qui surviennent dans la quantité d'ARN messenger codant pour la protéine cible. Nos résultats montrent bien la diminution de la quantité d'ARNm présent dans la moelle épinière et dans les DRGs. En complément, la technique la plus fréquemment utilisée pour ce qui est de la présence de la protéine, le produit final du gène, est l'immunobuvardage western (*Western blot*). Cette méthode nous a permis d'obtenir une idée grossière de l'efficacité du *knockdown* induit par les DsiRNA (voir **Annexe 2**). Nous avons pu observer une diminution de la quantité de protéine NTS2 contenue dans les DRGs et dans la moelle épinière lombaire des rats traités. Cela vient renforcer l'hypothèse que la diminution du transcrit entraîne une diminution de la protéine dans la cellule. L'inhibition n'est pas aussi forte au niveau protéique qu'au niveau du transcrit. Ce phénomène observé 24 heures après la dernière injection de DsiRNA était attendu car il se peut qu'une fraction de la protéine persiste en plus de possible stocks de récepteurs contenus dans des vésicules intra-cellulaires. Ces protéines non actives sur le plan fonctionnel sont quand même présentes dans la cellule. Il est nécessaire de vérifier le contenu en protéine NTS2 après 48 heures afin de vérifier si ce stock de récepteur s'épuise. Des analyses immunohistochimiques sur coupe de

moelle épinière et de ganglions de la racine dorsale nous permettraient d'avoir un portrait plus spécifique d'un point de vue anatomique de l'expression de NTS2. Cependant, le i-Fect produit un effet intrinsèque sur l'expression de la protéine NTS2. La cause de cet effet est inconnue, mais les conséquences que peuvent avoir les lipides cationiques sur les niveaux transcriptionnels des cellules vont de l'augmentation de plusieurs gènes jusqu'à l'inhibition d'autres gènes et voir même la mort cellulaire (Akhtar, 2007). Même si la diminution de l'expression de NTS2 causée par le i-Fect n'est pas statistiquement significative, l'utilisation d'un transfectant qui ne cause pas ce genre d'effet serait préférable. Des tests à venir dans le laboratoire permettront de valider d'autres systèmes tels que des polymères cationiques ou des peptides transporteurs qui peuvent eux aussi faciliter l'intégration des siRNA par la cellule. Avoir différentes alternatives pourrait s'avérer utile afin d'éliminer des effets indésirables dus aux transfectants comme ceux discutés plus loin.

4. Validation comportementale.

Au-delà des données biochimiques, l'effet principal visé par une expérience d'interférence est l'effet global sur l'animal. Nous avons donc mesuré la réponse à un stimulus thermique en condition normale et suite à l'administration de JMV-431, un agoniste sélectif du récepteur NTS2 reconnu pour ses propriétés analgésiques (Sarret et al, 2005). L'inhibition de l'expression du récepteur NTS2 ne modifie pas significativement le niveau basal de réponse nociceptive chez les rats traités aux DsiRNA. Cela est en accord avec les données qui existent déjà chez les souris KO pour

ce récepteur (MAENO et al. , 2004). En effet, seules de très faibles modifications ont pu être observées au test de la plaque chaude dans des conditions très particulières. Nous pensons donc qu'en absence de douleur, NTS2 est exprimé à des niveaux assez faibles pour ne pas jouer de rôle significatif dans la perception du stimulus en douleur aiguë. Il est possible que nous observions des modifications de la réponse lorsque ces DsiRNA seront administrés à des animaux soumis à un modèle de douleur chronique. En effet, étant donné le rôle de la neurotensine dans l'inhibition descendante au niveau spinal, il est possible que ce soit uniquement dans ces conditions que les récepteurs de la neurotensine soient impliqués dans le niveau de réponse basal. Il sera intéressant d'injecter des DsiRNA ciblant NTS2 à des animaux neuropathiques, arthritiques ou cancéreux. Il a d'ailleurs été montré que des modifications de l'expression des récepteurs de la NT sont induites dans des modèles de douleur neuropathiques (ZHANG et al. , 1996, YANG et al. , 2004) Nous possédons chacun de ces modèles dans le laboratoire et ces expériences seront menés à court et moyen terme. Parallèlement, l'effet inhibiteur du i-Fect sur l'expression de NTS2 montré en PCR quantitatif n'est pas reflété au niveau comportemental, la réponse des animaux traités au i-Fect étant normale.

Suite à l'administration du JMV-431, les rats témoins (salin) subissent l'action analgésique de celui-ci qui se traduit par l'augmentation du temps de réponse au test du retrait de la queue. Cela concorde avec nos données précédentes sur le rôle de NTS2 dans la réponse nociceptive au niveau spinal (SARRET et al. , 2005). L'effet du JMV-431 est conservé, voir même un peu augmenté chez les animaux prétraités au i-Fect seulement. Cela renforce le constat disant que le i-Fect peut avoir un effet sur les niveaux

d'expression protéique mais que cela ne se traduit pas au niveau fonctionnel. Par contre, l'effet antinociceptif du JMV-431 est complètement perdu chez les animaux ayant reçu l'un ou l'autre des duplex de DsiRNA spécifiques à l'inhibition de NTS2 (NTS2v1-1 ou NTS2v2-5). En effet, ces animaux ont des latences quasiment normales lors du test.

Même si au départ le but de ce projet n'était pas vraiment d'élucider le rôle de NTS2 dans la douleur aiguë ou encore de caractériser l'effet antinociceptif du JMV-431, la séquence des manipulations perpétrées lors de l'étude a soulevé quelques questions. D'abord, on observe que lorsque le JMV-431 est injecté plusieurs jours de suite à des rats sains, son effet analgésique perd de son efficacité. En effet, on mesure des latences moyennes de près de 10 secondes lors du premier jour alors qu'on peine à atteindre les 6,5 secondes au jour 4 avec la même dose de JMV-431. Ce processus de désensibilisation n'était pas connu jusqu'à maintenant puisque c'était la première fois que nous injectons le JMV-431 de façon répétée à des rats. Ce phénomène demande à être approfondi et est précurseur d'une étude plus vaste sur la régulation du récepteur NTS2 suite à sa stimulation par des agonistes. En effet, il serait intéressant de corréler les changements comportementaux qui surviennent au fil des jours avec les niveaux d'expression du récepteurs NTS2 dans la moelle et les DRGs. Si nous observions que les récepteurs NTS2 sont moins abondants à la membrane plasmique, on pourrait alors parler d'une possible tolérance aux agonistes de ce récepteur qui nous forcerait à augmenter les dose au fil des traitements. Cette étude pourrait être réalisée à l'aide d'immunohistochimie pour mesurer les niveaux de protéines et en PCR quantitatif pour vérifier si ce n'est pas au niveau transcriptionnel qu'il y aurait régulation. Finalement, la microscopie électronique

pourrait nous renseigner sur la disponibilité du récepteur à la membrane, si la quantité brute de protéine ne varie pas en dépit d'une perte de fonction partielle. Par ailleurs, il est peu probable que l'acclimatation au test soit la cause de cette diminution de latence en réponse au JMV-431 puisque cette variation n'est pas observée dans d'autres groupes qui n'ont pas reçu l'agoniste. De plus, le réflexe mesuré en est un spinal et inconscient qui ne peut être contrôlé par une anticipation de l'animal.

Les effets comportementaux de l'inhibition du récepteur NTS2 ont été mesurés selon la réponse à son agoniste, le JMV-431. La diminution de la latence au test du retrait de la queue est significative pendant les deux ou trois jours suivant la dernière injection de DsiRNA. Au quatrième jour, les rats retrouvent des latences proches du niveau basal. Il peut s'agir du résultat de la dégradation des DsiRNA suite à l'action de nucléases mais ce phénomène se produit plus rapidement chez les rats que dans des cellules en cultures chez qui un retour de l'expression de 50% peut se produire en 7 jours (COLLINGWOOD et al. , 2008). L'utilisation de DsiRNA modifiés portant des nucléotides méthylés en 2' permettrait sans doute d'allonger la demi-vie des DsiRNA dans le SNC et ainsi d'en prolonger les effets comportementaux. En effet, ces modifications peuvent retarder de 48 heures le retour d'expression de l'ARNm en plus de supprimer la réponse IL-6 engendrée par le duplex non-modifié (COLLINGWOOD et al. , 2008).

5. Contrôles

La validité d'une étude avec des siRNA ou autres composés d'interférence repose surtout sur la qualité de ses contrôles. Ceux-ci visent d'abord à montrer que l'effet observé, autant au niveau biochimique que comportemental, est dû uniquement à l'inhibition de l'expression de la protéine ciblée. De plus, il doit être montré que les DsiRNA ne produisent pas d'effets indésirables qui pourraient semer le doute sur la spécificité de la modification produite. Tout d'abord, nous avons utilisé un duplex composé d'une séquence ne s'appariant à aucun ARN messenger chez le rat (appelé *scrambled*). Ce duplex ne produit pas d'effet au niveau expression et comportement. Cela nous permet d'éliminer un potentiel effet non-spécifique provenant de l'activation d'une voie séquence-indépendante ou dépendante.

De plus, nous avons produit et injecté deux duplex de séquences différentes ciblant le récepteur NTS2. Cette pratique n'était pas répandue au début de l'ère des siRNA mais est devenue depuis quelques années un contrôle de routine. Ces deux duplex ont produit les mêmes effets au niveau de l'expression de la protéine et de la réponse au JMV-431. Ce second contrôle confirme que l'effet observé est bel et bien le résultat de l'inhibition de l'expression de NTS2. De plus, nous sommes en mesure de dire que cette inhibition est séquence-dépendante puisque les deux duplex fonctionnent mais pas le *scrambled*.

Ensuite, nous devons vérifier au meilleur de nos capacités que les duplex ne produisaient pas d'effets hors-cibles en plus de celui visé. Pour ce faire, nous avons d'abord mesuré

l'effet que pouvaient avoir les DsiRNA visant NTS2 sur la réponse à un agoniste sélectif pour NTS1, le PD149163. La raison en est simple, NTS1 est le récepteur qui est le plus homologue, au niveau de la séquence nucléotidique et aminopeptidique, à NTS2. Les résultats de l'administration du PD149163 aux rats traités avec les DsiRNA-NTS2 sont les mêmes que chez les animaux normaux (voir **Annexe 3**). Cela confirme qu'il est peu probable que les DsiRNA NTS2 puissent s'apparier de manière séquence-spécifique à un autre ARN messenger, puisqu'il n'interagit pas avec le plus plausible d'entre eux, celui codant pour NTS1. Il nous reste maintenant à vérifier cette affirmation par PCR quantitative. Théoriquement, nous ne devrions pas observer de variation dans l'expression de l'ARN messenger NTS1.

L'autre principal effet hors cible connu des siRNA est l'activation de la réponse immunitaire. Plusieurs facteurs pro-inflammatoires ou indicateurs d'une activité immunitaire accrue peuvent être augmentés suite à la stimulation, entre autres, des récepteurs TLR7 et TLR8 (Akira 2004). Les exemples les plus documentés sont l'IFN- α et γ ainsi que différentes interleukines (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12), TNF- α et COX-II. Étant donné les faibles doses que nous utilisons pour nos expériences, notre hypothèse était que nous n'induirions pas d'inflammation. Nos résultats préliminaires ne montrent en effet aucune augmentation significative de COX-II chez les rats traités aux DsiRNA (Voir **Annexe 4**) en comparaison avec des rats traités au poly IC, un contrôle positif pour l'inflammation induite par les acides nucléiques. Ces études seront complétées prochainement avec plus d'animaux et d'autres facteurs d'inflammation. Par contre, la faible dose utilisée nous permet d'anticiper des résultats négatifs pour l'inflammation. Le poly IC n'a pas produit

un effet aussi significatif que nous l'anticipions au départ. En effet, il est possible que nous ayons utilisé une dose trop faible (1µg) pour observer un effet immunostimulateur. À la lumière d'une revue de littérature et de discussions avec des experts en la matière, il apparaît qu'une dose plus élevée (50µg) serait plus appropriée pour disposer d'un contrôle positif convaincant afin de bien valider l'absence de réponse immune chez les rats ayant reçu les DsiRNA. L'utilisation du lipopolysaccharide qui est une composante de la membrane des bactérie Gram- reconnu pour induire une forte réponse inflammatoire non-spécifique fournirait aussi un comparatif pour la réponse aux DsiRNA.

Un contrôle additionnel aurait pu être effectué pour prouver hors de tout doute que l'effet que nous observons au niveau comportemental est bien le résultat de l'action des DsiRNA. Il s'agit de modifier l'ARN messager cible pour le rendre résistant à l'appariement avec les DsiRNA (ECHEVERRI et al. , 2006). Cette technique développée *in vitro* permet de rendre l'organisme étudié résistant au siRNA administrées aux cellules. Les cellules sont transfectées avec un chromosome artificiel bactérien qui contient la séquence complète du gène ainsi que son promoteur naturel (KITTLER et al. , 2005). Lorsqu'on réalise les deux expériences d'interférence en parallèle, sur les cellules résistantes et sur les sauvages, on devrait avoir une lignée avec un changement de phénotype et l'autre sans. Aucun exemple dans la littérature ne permet de confirmer la faisabilité de cette technique chez l'animal. Cette méthode a aussi le désavantage d'être fastidieuse mais, si elle venait à se développer chez des modèles animaux, elle représenterait sûrement le meilleur contrôle.

6. Le i-Fect comme transfectant.

Les lipides cationiques sont maintenant bien implantés comme méthode d'administration de composés d'interférence. Plusieurs de ces lipides peuvent être utilisés pour mener à bien ces expériences. Par exemple, les composés commerciaux tels que l'oligofectamine et le DOTAP ont été utilisés avec succès chez la souris (SORENSEN et al. , 2003, VERMA et al. , 2003, ARNOLD et al. , 2007). Ces études visaient toutefois des cibles se trouvant dans le système cardiovasculaire et le lipofectant étaient administrés par voie systémique à forte concentration. Des études menées récemment chez les rats montrent bien que le i-Fect représente une formulation efficace pour l'acheminement de siRNA vers les cellules du système nerveux central (DONG et al. , 2007, LUO et al. , 2005). Ce sont ces précédents résultats obtenus par d'autres équipes qui ont orienté notre choix vers le i-Fect comme liquide de transfection. Nous avons, nous aussi, pu constater le potentiel du i-Fect comme transporteur d'acide nucléique dans le système nerveux. En effet, le i-Fect nous a permis d'obtenir de bons résultats d'inhibition pour NTS2 avec une fraction des DsiRNA que nous aurions dû utiliser si nous avions injecté des DsiRNA nus. Le mode d'action de ces lipides demeure cependant l'objet de débats. La plupart des experts en la matière s'entendent pour dire que les lipides cationiques sont probablement intégrés dans des endosomes suite à l'invagination de la membrane plasmique. La couche lipidique fusionnerait ensuite avec la membrane de l'endosome, leur contenu pouvant être relâché ou dégradé. Cette fusion fait encore l'objet de recherche et pourrait être responsable de l'instabilité de la membrane endosomale, d'où l'efficacité de la relâche des acides nucléiques et donc de la transfection. Cela semble d'ailleurs avoir été confirmé

en microscopie confocale lorsque nous avons évalué le taux de pénétration dans les cellules des DRG et de la moelle épinière. Nous avons en effet observé une fluorescence ponctiforme dans le cytoplasme laissant présager une intégration dans les endosomes.

Cette faible dose nous permettait également d'injecter les DsiRNA dans un volume réduit (10µl) sans risquer des problèmes de préparation menant à la précipitation des duplex comme nous en avons rencontré à 312,5pmol. Cette dernière est due à une trop grande diminution du ratio N/P. Ce rapport entre le nombre de groupement azotés positifs du lipide de transfection (N) et celui de phosphates négatifs de l'ARN (P) est un bon indicateur de l'efficacité anticipée de la transfection. Il est accepté qu'un rapport N/P d'au moins 5 est requis pour une stabilité optimale. Si ce ratio diminue de façon trop importante (2-3), l'acide nucléique risque de précipiter. En modifiant la formulation (plus de saline et moins de i-Fect), nous pourrions injecter des doses plus importantes de DsiRNA. Par contre, cela n'améliorera pas le ratio N/P et l'efficacité de la transfection pourrait s'en trouver compromise. L'augmentation du volume d'injection réglerait aussi ce problème.

Nous savons cependant que les lipides cationiques sont reconnus pour leur relative toxicité. En effet, ils peuvent participer à l'induction du système immunitaire et provoquer des effets hors-cible importants (AKHTAR et BENTER, I., 2007). En raison de leur charge positive, ils peuvent induire une instabilité dans la membrane cellulaire qui mène à la mort cellulaire ou encore à de l'inflammation. Ce genre de conséquences peut

poser problème dans une expérience où le composé est injecté par voie intrathécale car il pourrait modifier la réponse douloureuse. Nous n'avons pas observé ce phénomène chez nos animaux injectés. L'examen visuel post-mortem ne permettait pas non plus de dire s'il y avait mort cellulaire, des rougeurs ou de l'enflure, signes d'inflammation. De plus, les analyses par PCR quantitatif n'ont pas montré d'augmentation des facteurs pro-inflammatoires COX-2 et IFN- γ (voir **Annexe 4**). Ces expériences ont été menées sur un nombre restreint d'animaux et ne peuvent établir avec certitude que le i-Fect n'induit pas d'effet. Il importe d'effectuer des analyses plus poussées afin de quantifier la possible induction de gènes pro-inflammatoires dans la moelle épinière et les DRGs. En plus des gènes précédemment analysés, nous pouvons examiner la production de cytokines telles que IL-1 β , IL-6 et IL-12, ou encore du TNF α . L'expression de ces gènes peut être visualisée via la quantification de l'ARN messager par qPCR dans les tissus nerveux ou bien en quantifiant la présence de facteurs pro-inflammatoires sécrétés dans le liquide céphalo-rachidien par la technique d'ELISA. Un examen histologique des tissus pourrait aussi nous renseigner sur de possible lésions qui peuvent survenir dans les tissus suite à l'inflammation.

Ces modifications au niveau de la moelle et des DRGs pourraient être responsables des symptômes d'ataxie induite par le i-Fect qui ont été observés chez la souris (Lacroix-Fralish et Mogil, communication personnelle, non publié). Ces symptômes n'étaient pas apparents chez nos rats et aucune analyse n'a été perpétrée en ce sens. Il est à noter que ces souris ont reçu, proportionnellement parlant, des doses beaucoup plus fortes de i-Fect. Les rats sont probablement exempts de ces effets néfastes vu la faible dose de transfectant

utilisée. Une différence inter-espèce pourrait aussi expliquer ce phénomène, puisque la réponse de la souris ou du rat à un agent extérieur peut ne pas être la même.

Si le i-Fect n'a pas produit trop d'effets indésirables pour ce qui est des expériences en douleur aiguë, il en fût autrement pour les expériences de douleur tonique. En effet, notre équipe a aussi voulu montrer l'effet des DsiRNA spécifiques pour NTS2 dans un modèle de douleur tonique, soit le test à la formaline. Ces expériences ont été limitées à un stade précoce puisque le i-Fect produisait en lui-même un effet antinociceptif à la fin de la deuxième phase du test. Ces résultats vont à l'encontre de nos attentes puisque les lipides cationiques sont plutôt reconnus pour leurs effets inflammatoires. Cela devrait avoir pour effet d'augmenter la réponse douloureuse. Néanmoins, cela rend difficile l'interprétation précise de l'effet des DsiRNA sur la réponse nociceptive dans ce test (voir **Annexe 5**). L'utilisation d'un autre transfectant pourrait permettre de poursuivre les expériences mais nos résultats préliminaires ne vont pas en ce sens pour l'instant. En effet, nous avons utilisé des polymères cationiques (Jet-PEI, Polyplus Transfection; pn-fect, Neuromics) et un autre lipide cationique (Interferin, Polyplus Transfection) et cet effet d'inhibition de la réponse douloureuse était présent à chaque fois. Ces produits de transfection partagent une caractéristique : la charge nette positive. Cette charge positive est considérée comme la cause de la déstabilisation de la membrane endosomale. Si cette déstabilisation se produit au niveau de la membrane plasmique, elle pourrait changer les propriétés de la cellule nerveuse et altérerait sa façon de transmettre le signal douloureux. Malgré tout, le i-Fect nous a permis d'établir avec précision l'efficacité des DsiRNA in vivo dans un modèle de douleur aiguë et pourra sans doute servir dans d'autres systèmes plus

chroniques lorsque nous aurons mis au point une formulation, probablement moins concentrée en i-Fect, qui n'interfère pas avec les mesures de douleur.

7. Perspectives

Les DsiRNA sont de bons outils pour l'élucidation de la fonction des gènes *in vitro* et comme nous l'avons montré, ils peuvent aussi servir *in vivo* dans le système nerveux central. Maintenant que nous savons cela, la porte est ouverte pour l'utilisation de ces composés pour de la recherche dans un but thérapeutique. La technologie d'interférence par l'ARN est déjà transférée à l'homme. Une étude clinique portant sur la dégénérescence maculaire a même atteint la phase III. Nous sommes sûrement sur le point de voir sur le marché les premiers médicaments utilisant l'interférence par l'ARN, surtout pour des utilisations au niveau topique comme dans le cas de cette étude. Par contre, un certain nombre de questions demeure quant à des applications au niveau systémique ou du système nerveux. Tout d'abord, sommes-nous sûr qu'aucun effet immunostimulateur ne peut être attribué aux DsiRNA? Nous ne pourrons le savoir que lorsque nous aurons quantifié l'expression relative d'une très large gamme de molécules pro-inflammatoires et que les patrons d'expression seront comparés à un contrôle positif convaincant. Nous devons aussi tester des doses plus fortes que celle que nous avons utilisées dans nos expériences afin de nous donner un éventail de doses que nous pourrons administrer. Pendant ce temps, les siRNA conventionnels vont poursuivre leur validation clinique dans des études portant sur un nombre croissant de pathologies.

Dès lors, il nous sera possible d'appliquer cette technologie à des modèles de maladie de Parkinson, de maladie d'Alzheimer, de sclérose en plaque ou dans notre cas, de douleur chronique. Il faudra alors vérifier si des injections intrathécales ponctuelles sont vraiment la solution pour ces modèles. Nous allons prochainement mettre au point l'administration des DsiRNA au moyen de mini-pompes osmotiques. Celles-ci sont implantées sous la peau de l'animal et peuvent délivrer la quantité de drogue voulue au niveau intrathécal à l'aide d'un cathéter. La dose efficace reste à déterminer mais ces pompes pourraient représenter une méthode de choix pour l'administration continue des DsiRNA dans une expérience s'échelonnant sur 14, 21 et même 28 jours. Cette méthode représente l'avenir particulièrement dans le cas du traitement de la douleur chronique puisqu'elle ne peut pas être traitée par des injections intrathécales répétées. À ce moment là, il sera nécessaire d'évaluer l'effet qu'aura l'inhibition d'un gène sur une très longue période. Il est aussi possible que des effets secondaires jamais observés à ce jour se manifestent au bout d'un certain temps. Finalement, comme c'est parfois observé chez des souris invalidées pour un gène, un effet compensatoire exercé par un autre gène pourrait entrer en jeu et nous perdrons alors l'effet souhaité. Toutes ces expériences devront être menées au cours des prochaines années afin de faire avancer les siRNA et les DsiRNA vers une plus large utilisation thérapeutique et clinique.

Nous voulons également utiliser des DsiRNA visant des cibles différentes. En effet, notre laboratoire s'intéresse à plusieurs acteurs dans la transmission de la nociception autres que NTS2. Nous avons déjà commencé la validation de DsiRNA spécifiques pour le récepteur NTS1 et nous attendons avec impatience l'occasion de tester des duplex conçus

pour la chimiokine MCP-1 et son récepteur CCR2. Ce ne sont que quelques exemples de ce qui nous attend dans l'avenir avec les DsiRNA.

8. Conclusion

L'étude présentée dans ce mémoire démontre l'efficacité des *Dicer substrate siRNA* dans l'inhibition de l'expression du récepteur NTS2 au niveau du système nerveux central. À l'aide d'une approche originale à la fois biochimique et comportementale, nous avons été en mesure d'éliminer les causes de mauvaises interprétations et nous avons prouvé que l'effet d'interférence observé était bien le résultat des DsiRNA. Dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques, il convient maintenant de considérer les DsiRNA comme un outil fiable et efficace qui pourra éventuellement être transféré à l'homme pour le traitement de pathologies telles que la douleur chronique, certaines infections virales ou certains cancers. Les chercheurs doivent maintenant se concentrer sur de meilleures méthodes d'acheminement afin qu'il soit possible d'administrer des doses décroissantes dans des conditions sécuritaires.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon superviseur Philippe Sarret. La personne la plus importante pour un étudiant gradué au cours de son cheminement est son mentor. C'est par lui que tout commence, du choix du projet à l'intégration dans l'équipe. C'est aussi par lui que l'étudiant est stimulé, qu'il cherche à se dépasser, qu'il pousse sa réflexion ou qu'il cherche un encouragement, une motivation. C'est avant tout un accompagnateur et ça, Philippe, tu l'accomplis avec brio et dans la bonne humeur en plus. Je t'en remercie.

Je remercie mes autres accompagnateurs Nicolas Beudet et Karine Belleville. Nick est, je l'ai déjà dit, à la fois une grande tape sur l'épaule et un bon coup de pied au cul. Ce n'est pas toujours agréable et parfois on se demande si c'était juste pour nous faire travailler plus, mais je m'aperçois toujours que dans le fond il veut juste que j'exploite mon potentiel au maximum. Merci de parfois me pousser à bout et de me rendre meilleur. Karine est une experte en son domaine et j'ai énormément appris à ses côtés. J'ai aussi trouvé en elle une oreille attentive que ce soit pour les affaires du labo que pour celles de nos petites familles. Merci pour ton écoute et tes conseils.

Quand je suis arrivé dans le labo, il y en a un qui m'a pris par la main et qui m'a tout montré ce qu'il savait. Je te remercie Marc-André pour avoir facilité mon arrivée et pour avoir été un compagnon hors pair à Sherbrooke et en France. Nos années de doctorat seront très agréables, j'en suis convaincu.

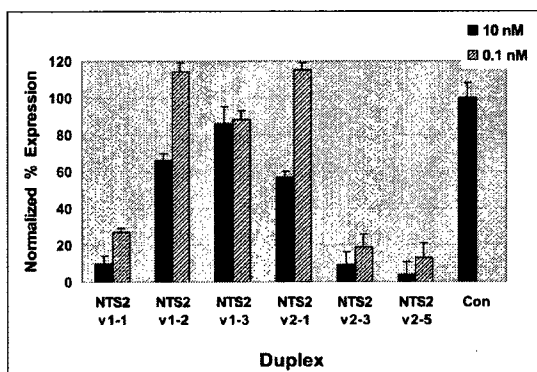
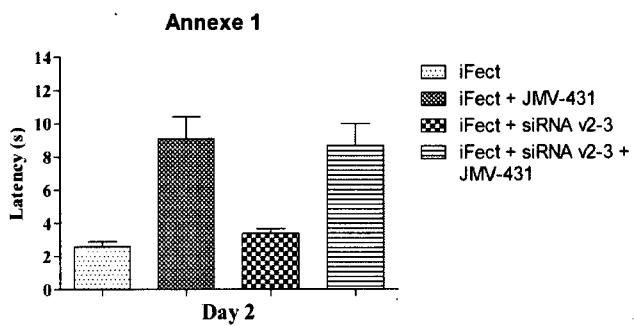
À ma droite, j'ai appris tranquillement à découvrir une fille qui aime parler et à la curiosité scientifique très aiguisée. Geneviève, tu es devenue pendant ces deux années une collègue très importante et une véritable amie. Tant qu'on aura notre doyenne je suis sûr que le labo va se porter à merveille.

Je remercie également Mylène de partager ses expériences de la vie et du labo avec moi. C'est avec une grande joie que j'ai appris à te connaître et je suis bien content que tu aies accepté de vieillir à nos côtés...

Un petit merci à Mounir pour sa compagnie agréable. Un autre pour nos stagiaires Marc, Stéphanie, Marie-Josée et Houssine.

Je remercie Vanessa pour son soutien constant. Rien ne me fait plus plaisir que quand tu me dis que tu es fière de moi. J'espère te fournir encore des occasions de te l'entendre dire. Je te remercie aussi pour ma plus grande motivation, soit ma petite coccinelle. Merci aussi à mes parents pour leur support.

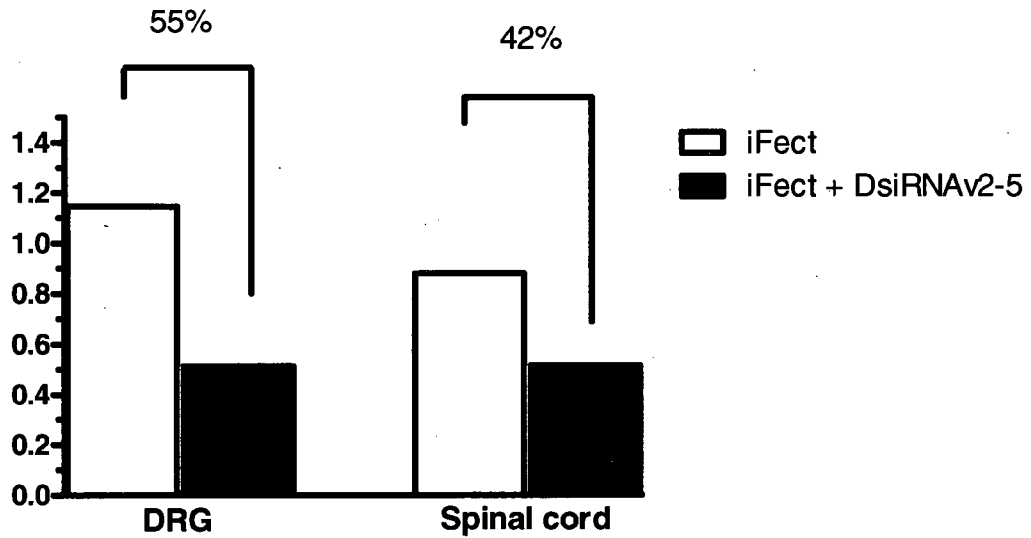
Finalement, je tiens à remercier Dr Luc Paquet, Dr Éric Rousseau et Dr Philippe Sarret pour avoir accepté de reviser ce mémoire. Vous l'avez fait avec minutie et esprit critique. Je vous en suis reconnaissant.



Annexe 1. Effet du duplex NTS2v2-3 sur l'effet anti-nociceptif du JMV-431. Aucune modification du niveau de perception basal suite à l'administration des DsiRNA n'est observée. L'analgésie induite par le JMV-431 n'est pas non plus modifiée. Graphique du haut: N=6-7

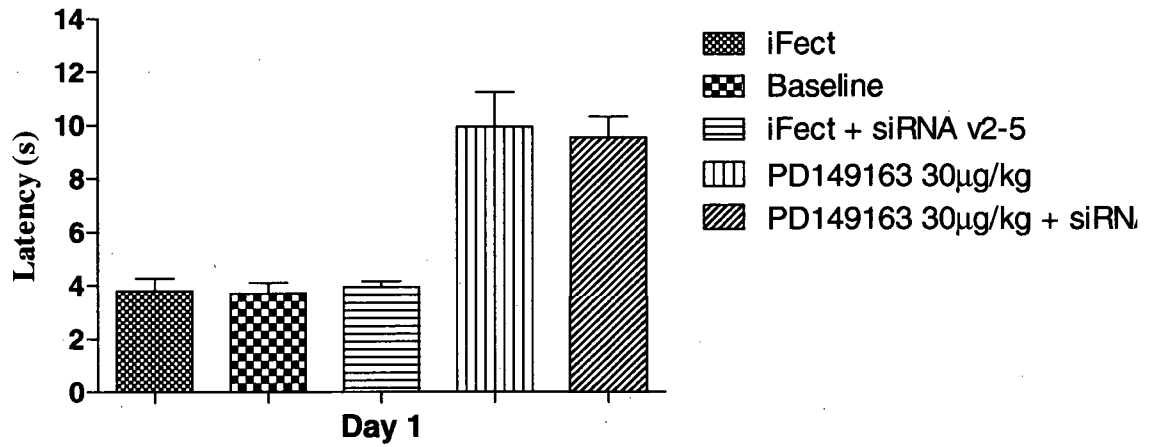
Figure S1

Annexe 2



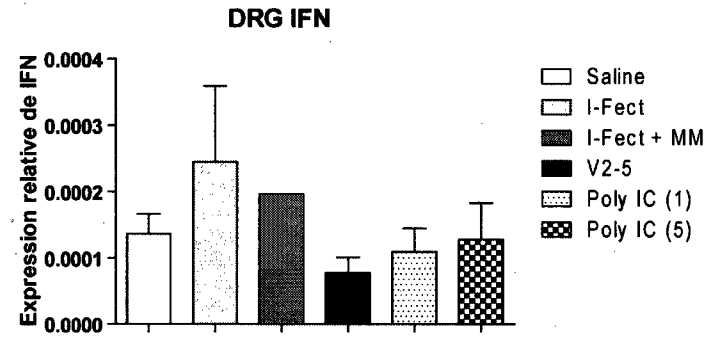
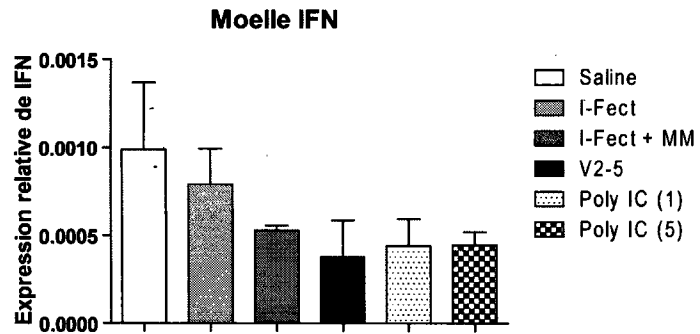
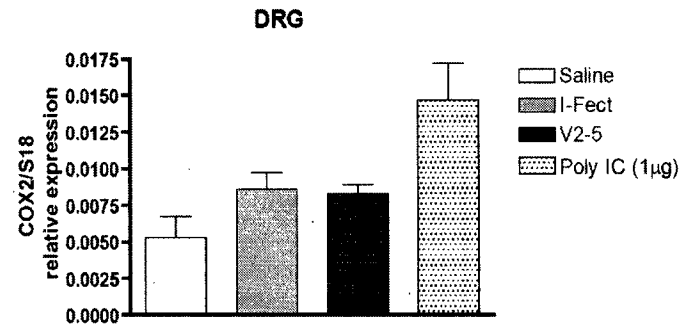
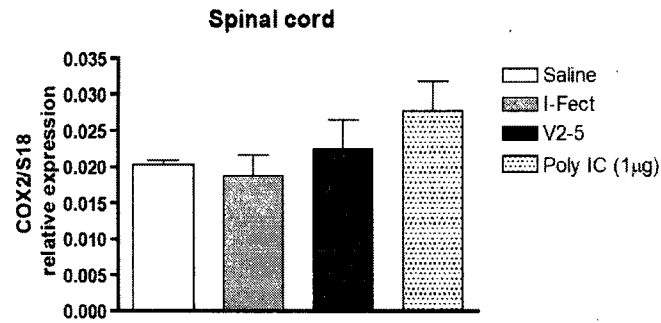
Annexe 2. Effet de l'administration des DsiRNA (duplex NTS2v2-5) sur l'expression de la protéine NTS2 dans la moelle épinière et les DRG. Le pré-traitement aux DsiRNA diminue la quantité de récepteurs NTS2 de 55% dans les DRG et de 42 % dans la moelle épinière. N=3

Annexe 3



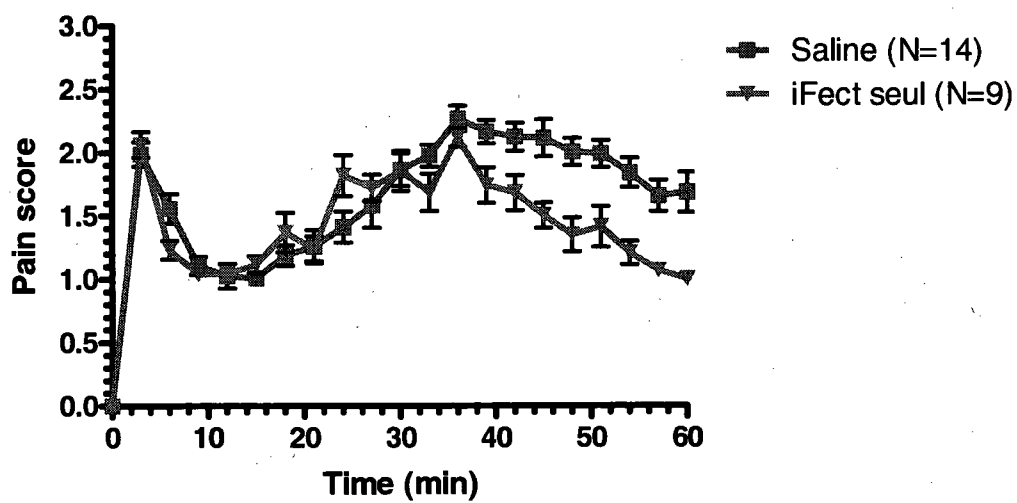
Annexe 3. Effet des DsiRNA sur la réponse analgésique induite par le PD149163. L'antinociception n'est pas modifiée suite au pré-traitement avec les DsiRNA NTS2v2-5. N=6

Annexe 4



Annexe 4. Effet des DsiRNA sur l'expression de COX-II (hat) et IFN (bas) dans la moelle épinière (gauche) et les DRG (droite). Aucune modification significative de l'expression de ces gènes n'est observée suite à l'administration des DsiRNA en comparaison avec le contrôle positif (poly IC) (N=2-4)

Annexe 5



Annexe 5. Effet du i-Fect sur la réponse nociceptive dans le test à la formaline. Notez la diminution de la réponse dans la phase inflammatoire tardive (35-60 minutes).

RÉFÉRENCES

- Agrawal, N., Dasaradhi P. V., Mohmmed A., Malhotra P., Bhatnagar R. K. et Mukherjee S. K. (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 67:657-685.
- Aharinejad, S., Paulus P., Sioud M., Hofmann M., Zins K., Schafer R., Stanley E. R. et Abraham D. (2004) Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice. *Cancer Res.* 64:5378-5384.
- Aigner, A. (2006) Delivery Systems for the Direct Application of siRNAs to Induce RNA Interference (RNAi) In Vivo. *J.Biomed.Biotechnol.* 2006:71659.
- Akhtar, S. et Benter I. (2007) Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 59:164-182.
- Akhtar, S. et Benter I. F. (2007) Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J.Clin.Invest.* 117:3623-3632.
- Aleman, L. M., Doench J. et Sharp P. A. (2007) Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *RNA* 13:385-395.
- Altier, C., Dale C. S., Kisilevsky A. E., Chapman K., Castiglioni A. J., Matthews E. A., Evans R. M., Dickenson A. H., Lipscombe D., Vergnolle N. et Zamponi G. W. (2007) Differential role of N-type calcium channel splice isoforms in pain. *J.Neurosci.* 27:6363-6373.
- Amarzguioui, M., Lundberg P., Cantin E., Hagstrom J., Behlke M. A. et Rossi J. J. (2006) Rational design and in vitro and in vivo delivery of Dicer substrate siRNA. *Nat.Protoc.* 1:508-517.
- Arnold, R. S., He J., Remo A., Ritsick D., Yin-Goen Q., Lambeth J. D., Datta M. W., Young A. N. et Petros J. A. (2007) Nox1 expression determines cellular reactive oxygen and modulates c-fos-induced growth factor, interleukin-8, and Cav-1. *Am.J.Pathol.* 171:2021-2032.
- Audouy, S. A., de Leij L. F., Hoekstra D. et Molema G. (2002) In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. *Pharm.Res.* 19:1599-1605.

- Behlke, M. A. (2006) Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol. Ther.* 13:644-670.
- Bernstein, E., Denli A. M. et Hannon G. J. (2001) The rest is silence. *RNA* 7:1509-1521.
- Botto, J. M., Chabry J., Sarret P., Vincent J. P. et Mazella J. (1998) Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243:585-590.
- Botto, J. M., Guillemare E., Vincent J. P. et Mazella J. (1997) Effects of SR 48692 on neurotensin-induced calcium-activated chloride currents in the *Xenopus* oocyte expression system: agonist-like activity on the levocabastine-sensitive neurotensin receptor and absence of antagonist effect on the levocabastine insensitive neurotensin receptor. *Neurosci. Lett.* 223:193-196.
- Braasch, D. A., Jensen S., Liu Y., Kaur K., Arar K., White M. A. et Corey D. R. (2003) RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 42:7967-7975.
- Carraway, R. et Leeman S. E. (1973) The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J. Biol. Chem.* 248:6854-6861.
- Chabry, J., Labbe-Jullie C., Gully D., Kitabgi P., Vincent J. P. et Mazella J. (1994) Stable expression of the cloned rat brain neurotensin receptor into fibroblasts: binding properties, photoaffinity labeling, transduction mechanisms, and internalization. *J. Neurochem.* 63:19-27.
- Christoph, T., Grunweller A., Mika J., Schafer M. K., Wade E. J., Weihe E., Erdmann V. A., Frank R., Gillen C. et Kurreck J. (2006) Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350:238-243.
- Clineschmidt, B. V. et McGuffin J. C. (1977) Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur. J. Pharmacol.* 46:395-396.
- Clineschmidt, B. V., McGuffin J. C. et Bunting P. B. (1979) Neurotensin: antinocisponsive action in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 54:129-139.
- Collingwood, M. A., Rose S. D., Huang L., Hillier C., Amarzguioui M., Wiiger M. T., Soifer H. S., Rossi J. J. et Behlke M. A. (2008) Chemical modification patterns

compatible with high potency dicer-substrate small interfering RNAs. *Oligonucleotides* 18:187-200.

Cotter, M. J. et Muruve D. A. (2005) The induction of inflammation by adenovirus vectors used for gene therapy. *Front.Biosci.* 10:1098-1105.

Cullen, L. M. et Arndt G. M. (2005) Genome-wide screening for gene function using RNAi in mammalian cells. *Immunol.Cell Biol.* 83:217-223.

Dass, C. R. (2002) Cytotoxicity issues pertinent to lipoplex-mediated gene therapy in vivo. *J.Pharm.Pharmacol.* 54:593-601.

DeLeo, J. A., Colburn R. W., Rickman A. J. et Yeager M. P. (1997) Intrathecal catheterization alone induces neuroimmune activation in the rat. *Eur.J.Pain* 1:115-122.

Dong, X. W., Goregoaker S., Engler H., Zhou X., Mark L., Crona J., Terry R., Hunter J. et Priestley T. (2007) Small interfering RNA-mediated selective knockdown of Na(V)1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channel reverses mechanical allodynia in neuropathic rats. *Neuroscience* 146:812-821.

Dorn, G., Patel S., Wotherspoon G., Hemmings-Mieszczak M., Barclay J., Natt F. J., Martin P., Bevan S., Fox A., Ganju P., Wishart W. et Hall J. (2004) siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Res.* 32:e49.

Dubuc, I., Costentin J., Terranova J. P., Barnouin M. C., Soubrie P., Le Fur G., Rostene W. et Kitabgi P. (1994) The nonpeptide neurotensin antagonist, SR 48692, used as a tool to reveal putative neurotensin receptor subtypes. *Br.J.Pharmacol.* 112:352-354.

Dubuc, I., Remande S. et Costentin J. (1999a) The partial agonist properties of levocabastine in neurotensin-induced analgesia. *Eur.J.Pharmacol.* 381:9-12.

Dubuc, I., Remande S. et Costentin J. (1999b) The partial agonist properties of levocabastine in neurotensin-induced analgesia. *Eur.J.Pharmacol.* 381:9-12.

Dubuc, I., Sarret P., Labbe-Jullie C., Botto J. M., Honore E., Bourdel E., Martinez J., Costentin J., Vincent J. P., Kitabgi P. et Mazella J. (1999c) Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J.Neurosci.* 19:503-510.

Duxbury, M. S., Ito H., Zinner M. J., Ashley S. W. et Whang E. E. (2004) RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. *Oncogene* 23:1539-1548.

- Echeverri, C. J., Beachy P. A., Baum B., Boutros M., Buchholz F., Chanda S. K., Downward J., Ellenberg J., Fraser A. G., Hacohen N., Hahn W. C., Jackson A. L., Kiger A., Linsley P. S., Lum L., Ma Y., Mathey-Prevot B., Root D. E., Sabatini D. M., Taipale J., Perrimon N. et Bernards R. (2006) Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat.Methods* 3:777-779.
- Ehlers, R. A., Zhang Y., Hellmich M. R. et Evers B. M. (2000) Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 269:704-708.
- Elbashir, S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. et Tuschl T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
- Elbashir, S. M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W. et Tuschl T. (2001b) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20:6877-6888.
- Filleur, S., Courtin A., Ait-Si-Ali S., Guglielmi J., Merle C., Harel-Bellan A., Clezardin P. et Cabon F. (2003) siRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth. *Cancer Res.* 63:3919-3922.
- Fire, A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E. et Mello C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Foust, K. D., Poirier A., Pacak C. A., Mandel R. J. et Flotte T. R. (2008) Neonatal intraperitoneal or intravenous injections of recombinant adeno-associated virus type 8 transduce dorsal root ganglia and lower motor neurons. *Hum.Gene Ther.* 19:61-70.
- Friend, D. S., Papahadjopoulos D. et Debs R. J. (1996) Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim.Biophys.Acta* 1278:41-50.
- Gabra, B. H., Kessler F. K., Ritter J. K., Dewey W. L. et Smith F. L. (2007) Decrease in N-methyl-D-aspartic acid receptor-NR2B subunit levels by intrathecal short-hairpin RNA blocks group I metabotropic glutamate receptor-mediated hyperalgesia. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 322:186-194.

Gailly, P., Najimi M. et Hermans E. (2000) Evidence for the dual coupling of the rat neurotensin receptor with pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins. *FEBS Lett.* 483:109-113.

Garraway, S. M., Xu Q. et Inturrisi C. E. (2007) Design and evaluation of small interfering RNAs that target expression of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene in the spinal cord dorsal horn. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 322:982-988.

Geisbert, T. W., Hensley L. E., Kagan E., Yu E. Z., Geisbert J. B., Daddario-DiCaprio K., Fritz E. A., Jahrling P. B., McClintock K., Phelps J. R., Lee A. C., Judge A., Jeffs L. B. et MacLachlan I. (2006) Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference. *J.Infect.Dis.* 193:1650-1657.

Gendron, L., Perron A., Payet M. D., Gallo-Payet N., Sarret P. et Beaudet A. (2004) Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol.Pharmacol.* 66:1421-1430.

Giladi, H., Ketzinel-Gilad M., Rivkin L., Felig Y., Nussbaum O. et Galun E. (2003) Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol.Ther.* 8:769-776.

Grunweller, A., Wyszko E., Bieber B., Jahnel R., Erdmann V. A. et Kurreck J. (2003) Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res.* 31:3185-3193.

Guha, S., Lunn J. A., Santiskulvong C. et Rozengurt E. (2003) Neurotensin stimulates protein kinase C-dependent mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res.* 63:2379-2387.

Gully, D., Labeeuw B., Boigegrain R., Oury-Donat F., Bachy A., Poncelet M., Steinberg R., Suaud-Chagny M. F., Santucci V., Vita N., Pecceu F., Labbe-Jullie C., Kitabgi P., Soubrie P., Le Fur G. et Maffrand J. P. (1997) Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 280:802-812.

Hermans, E., Octave J. N. et Maloteaux J. M. (1994) Receptor mediated internalization of neurotensin in transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochem.Pharmacol.* 47:89-91.

Hornung, V., Guenther-Biller M., Bourquin C., Ablasser A., Schlee M., Uematsu S., Noronha A., Manoharan M., Akira S., de Fougères A., Endres S. et Hartmann G. (2005) Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat.Med.* 11:263-270.

Huang, Z., Zhang K., Chen X., Meng J. et Chen D. (2008) Effect of siRNA targeted against MKK4 on myostatin-induced downregulation of differentiation marker gene expression. *Mol.Cell.Biochem.* 310:241-244.

Hunt, S. P. et Mantyh P. W. (2001) The molecular dynamics of pain control. *Nat.Rev.Neurosci.* 2:83-91.

Hylden, J. L. et Wilcox G. L. (1983) Antinociceptive action of intrathecal neurotensin in mice. *Peptides* 4:517-520.

Isacson, R., Kull B., Salmi P. et Wahlestedt C. (2003) Lack of efficacy of 'naked' small interfering RNA applied directly to rat brain. *Acta Physiol.Scand.* 179:173-177.

Ishizuka, J., Townsend C. M., Jr et Thompson J. C. (1993) Neurotensin regulates growth of human pancreatic cancer. *Ann.Surg.* 217:439-45; discussion 446.

Izant, J. G. et Weintraub H. (1984) Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36:1007-1015.

Jackson, A. L., Burchard J., Schelter J., Chau B. N., Cleary M., Lim L. et Linsley P. S. (2006) Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12:1179-1187.

Judge, A. D., Bola G., Lee A. C. et MacLachlan I. (2006) Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol.Ther.* 13:494-505.

Judge, A. D., Sood V., Shaw J. R., Fang D., McClintock K. et MacLachlan I. (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat.Biotechnol.* 23:457-462.

Julius, D. et Basbaum A. I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.

Kasama, S., Kawakubo M., Suzuki T., Nishizawa T., Ishida A. et Nakayama J. (2007) RNA interference-mediated knock-down of transient receptor potential vanilloid 1 prevents forepaw inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur.J.Neurosci.* 25:2956-2963.

- Khalil, I. A., Kogure K., Akita H. et Harashima H. (2006) Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol.Rev.* 58:32-45.
- Kim, D. H., Behlke M. A., Rose S. D., Chang M. S., Choi S. et Rossi J. J. (2005) Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat.Biotechnol.* 23:222-226.
- Kim, J. Y., Choung S., Lee E. J., Kim Y. J. et Choi Y. C. (2007) Immune Activation by siRNA/Liposome Complexes in Mice Is Sequence- independent: Lack of a Role for Toll-like Receptor 3 Signaling. *Mol.Cells* 24:247-254.
- Kitabgi, P. (2006a) Differential processing of pro-neurotensin/neuromedin N and relationship to pro-hormone convertases. *Peptides* 27:2508-2514.
- Kitabgi,P. (2006b) Prohormone convertases differentially process pro-neurotensin/neuromedin N in tissues and cell lines. *J.Mol.Med.* 84:628-634.
- Kitabgi,P. (2002) Targeting neurotensin receptors with agonists and antagonists for therapeutic purposes. *Curr.Opin.Drug Discov.Devel.* 5:764-776.
- Kitabgi, P., Carraway R. et Leeman S. E. (1976) Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *J.Biol.Chem.* 251:7053-7058.
- Kittler, R., Pelletier L., Ma C., Poser I., Fischer S., Hyman A. A. et Buchholz F. (2005) RNA interference rescue by bacterial artificial chromosome transgenesis in mammalian tissue culture cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102:2396-2401.
- Klein, R. L., Dayton R. D., Leidenheimer N. J., Jansen K., Golde T. E. et Zweig R. M. (2006) Efficient neuronal gene transfer with AAV8 leads to neurotoxic levels of tau or green fluorescent proteins. *Mol.Ther.* 13:517-527.
- Kobayashi, H., Kitamura T., Sekiguchi M., Homma M. K., Kabuyama Y., Konno S., Kikuchi S. et Homma Y. (2007) Involvement of EphB1 receptor/EphrinB2 ligand in neuropathic pain. *Spine* 32:1592-1598.
- Krichevsky, A. M. et Kosik K. S. (2002) RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99:11926-11929.
- Kumar, P., Lee S. K., Shankar P. et Manjunath N. (2006) A single siRNA suppresses fatal encephalitis induced by two different flaviviruses. *PLoS Med.* 3:e96.

Labbe-Jullie, C., Dubuc I., Brouard A., Doulut S., Bourdel E., Pelaprat D., Mazella J., Martinez J., Rostene W. et Costentin J. (1994) In vivo and in vitro structure-activity studies with peptide and pseudopeptide neurotensin analogs suggest the existence of distinct central neurotensin receptor subtypes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 268:328-336.

Lappalainen, K., Jaaskelainen I., Syrjanen K., Urtti A. et Syrjanen S. (1994) Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm.Res.* 11:1127-1131.

Lin, C. R., Amaya F., Barrett L., Wang H., Takada J., Samad T. A. et Woolf C. J. (2006) Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 319:1096-1103.

Lingor, P. et Bahr M. (2007) Targeting neurological disease with RNAi. *Mol.Biosyst* 3:773-780.

Liu, S. C., Yang J. J., Shao K. N. et Chueh P. J. (2008) RNA interference targeting tNOX attenuates cell migration via a mechanism that involves membrane association of Rac. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 365:672-677.

Luo, M. C., Zhang D. Q., Ma S. W., Huang Y. Y., Shuster S. J., Porreca F. et Lai J. (2005) An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons. *Mol.Pain* 1:29.

Ma, W. et Quirion R. (2005) The ERK/MAPK pathway, as a target for the treatment of neuropathic pain. *Expert Opin.Ther.Targets* 9:699-713.

Ma, Y., Chan C. Y. et He M. L. (2007) RNA interference and antiviral therapy. *World J.Gastroenterol.* 13:5169-5179.

Madry, H., Reszka R., Bohlender J. et Wagner J. (2001) Efficacy of cationic liposome-mediated gene transfer to mesangial cells in vitro and in vivo. *J.Mol.Med.* 79:184-189.

Maeno, H., Yamada K., Santo-Yamada Y., Aoki K., Sun Y. J., Sato E., Fukushima T., Ogura H., Araki T., Kamichi S., Kimura I., Yamano M., Maeno-Hikichi Y., Watase K., Aoki S., Kiyama H., Wada E. et Wada K. (2004) Comparison of mice deficient in the high- or low-affinity neurotensin receptors, Ntsr1 or Ntsr2, reveals a novel function for Ntsr2 in thermal nociception. *Brain Res.* 998:122-129.

- Makimura, H., Mizuno T. M., Mastaitis J. W., Agami R. et Mobbs C. V. (2002) Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neurosci.* 3:18.
- Manche, L., Green S. R., Schmedt C. et Mathews M. B. (1992) Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol. Cell. Biol.* 12:5238-5248.
- Marques, J. T. et Williams B. R. (2005) Activation of the mammalian immune system by siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 23:1399-1405.
- Martin, G. E. et Naruse T. (1982) Differences in the pharmacological actions of intrathecally administered neurotensin and morphine. *Regul. Pept.* 3:97-103.
- Martin, S., Navarro V., Vincent J. P. et Mazella J. (2002) Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 123:1135-1143.
- Martin, S. E. et Caplen N. J. (2007) Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8:81-108.
- Merskey, H. M. et Bogduk N. (1994) Classification of Chronic Pain. 2nd ed.:211.
- Millan, M. J. (2002) Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66:355-474.
- Mohr, L., Yoon S. K., Eastman S. J., Chu Q., Scheule R. K., Scaglioni P. P., Geissler M., Heintges T., Blum H. E. et Wands J. R. (2001) Cationic liposome-mediated gene delivery to the liver and to hepatocellular carcinomas in mice. *Hum. Gene Ther.* 12:799-809.
- Morita, K., Kitayama T., Morioka N. et Dohi T. (2008a) Glycinergic mediation of tactile allodynia induced by platelet-activating factor (PAF) through glutamate-NO-cyclic GMP signalling in spinal cord in mice. *Pain* 138:525-536.
- Morita, K., Motoyama N., Kitayama T., Morioka N., Kifune K. et Dohi T. (2008b) Spinal antiallodynia action of glycine transporter inhibitors in neuropathic pain models in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326:633-645.
- Moroson, H. (1971) Polycation- treated tumor cells in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 31:373-380.

- Omidi, Y., Barar J. et Akhtar S. (2005) Toxicogenomics of cationic lipid-based vectors for gene therapy: impact of microarray technology. *Curr.Drug Deliv.* 2:429-441.
- Pelaprat, D. (2006) Interactions between neurotensin receptors and G proteins. *Peptides* 27:2476-2487.
- Perron, A., Sarret P., Gendron L., Stroh T. et Beaudet A. (2005) Identification and functional characterization of a 5-transmembrane domain variant isoform of the NTS2 neurotensin receptor in rat central nervous system. *J.Biol.Chem.* 280:10219-10227.
- Pettibone, D. J., Hess J. F., Hey P. J., Jacobson M. A., Leviten M., Lis E. V., Mallorga P. J., Pascarella D. M., Snyder M. A., Williams J. B. et Zeng Z. (2002) The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTR1 on central and peripheral responses to neurotensin. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 300:305-313.
- Pham, J. W. et Sontheimer E. J. (2004) The Making of an siRNA. *Mol.Cell* 15:163-164.
- Reich, S. J., Fosnot J., Kuroki A., Tang W., Yang X., Maguire A. M., Bennett J. et Tolentino M. J. (2003) Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol.Vis.* 9:210-216.
- Remaury, A., Vita N., Gendreau S., Jung M., Arnone M., Poncelet M., Culouscou J. M., Le Fur G., Soubrie P., Caput D., Shire D., Kopf M. et Ferrara P. (2002) Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res.* 953:63-72.
- Reynolds, A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W. S. et Khvorova A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat.Biotechnol.* 22:326-330.
- Robbins, M., Judge A., Liang L., McClintock K., Yaworski E. et MacLachlan I. (2007) 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Mol.Ther.* 15:1663-1669.
- Rose, S. D., Kim D. H., Amarzguioui M., Heidel J. D., Collingwood M. A., Davis M. E., Rossi J. J. et Behlke M. A. (2005) Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res.* 33:4140-4156.
- Rostene, W. H. et Alexander M. J. (1997) Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front.Neuroendocrinol.* 18:115-173.

Roussy, G., Dansereau M. A., Dore-Savard L., Belleville K., Beaudet N., Richelson E. et Sarret P. (2008) Spinal NTS1 receptors regulate nociceptive signaling in a rat formalin tonic pain model. *J.Neurochem.* 105:1100-1114.

Sarov, M. et Stewart A. F. (2005) The best control for the specificity of RNAi. *Trends Biotechnol.* 23:446-448.

Sarret, P., Esdaile M. J., Perron A., Martinez J., Stroh T. et Beaudet A. (2005) Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 neurotensin receptors. *J.Neurosci.* 25:8188-8196.

Sarret, P., Perron A., Stroh T. et Beaudet A. (2003) Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J.Comp.Neurol.* 461:520-538.

Schiffelers, R. M., Ansari A., Xu J., Zhou Q., Tang Q., Storm G., Molema G., Lu P. Y., Scaria P. V. et Woodle M. C. (2004) Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res.* 32:e149.

Siolas, D., Lerner C., Burchard J., Ge W., Linsley P. S., Paddison P. J., Hannon G. J. et Cleary M. A. (2005) Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat.Biotechnol.* 23:227-231.

Sioud, M. (2005) Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J.Mol.Biol.* 348:1079-1090.

Sledz, C. A. et Williams B. R. (2004) RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem.Soc.Trans.* 32:952-956.

Smith, D. J., Hawranko A. A., Monroe P. J., Gully D., Urban M. O., Craig C. R., Smith J. P. et Smith D. L. (1997) Dose-dependent pain-facilitatory and -inhibitory actions of neurotensin are revealed by SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist: influence on the antinociceptive effect of morphine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 282:899-908.

Sontheimer, E. J. (2005) Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 6:127-138.

Sorensen, D. R., Leirdal M. et Sioud M. (2003) Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J.Mol.Biol.* 327:761-766.

- Stamatatos, L., Leventis R., Zuckermann M. J. et Silvius J. R. (1988) Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes. *Biochemistry* 27:3917-3925.
- Tan, P. H., Yang L. C., Shih H. C., Lan K. C. et Cheng J. T. (2005) Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat. *Gene Ther.* 12:59-66.
- Tiscornia, G., Singer O., Ikawa M. et Verma I. M. (2003) A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100:1844-1848.
- Tschuch, C., Schulz A., Pscherer A., Werft W., Benner A., Hotz-Wagenblatt A., Barrionuevo L. S., Lichter P. et Mertens D. (2008) Off-target effects of siRNA specific for GFP. *BMC Mol.Biol.* 9:60.
- Tsui, C. C., Shankland S. J. et Pierchala B. A. (2006) Glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptor ret is a novel ligand-receptor complex critical for survival response during podocyte injury. *J.Am.Soc.Nephrol.* 17:1543-1552.
- Tyler, B. M., Jansen K., McCormick D. J., Douglas C. L., Boules M., Stewart J. A., Zhao L., Lacy B., Cusack B., Fauq A. et Richelson E. (1999) Peptide nucleic acids targeted to the neurotensin receptor and administered i.p. cross the blood-brain barrier and specifically reduce gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:7053-7058.
- Urban, M. O. et Smith D. J. (1993) Role of neurotensin in the nucleus raphe magnus in opioid-induced antinociception from the periaqueductal gray. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 265:580-586.
- Verma, U. N., Surabhi R. M., Schmaltieg A., Becerra C. et Gaynor R. B. (2003) Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clin.Cancer Res.* 9:1291-1300.
- Vincent, J. P., Mazella J. et Kitabgi P. (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* 20:302-309.
- Whelan, J. (2005) First clinical data on RNAi. *Drug Discov.Today* 10:1014-1015.

Yang, J., Yang Y., Chen J. M., Wang G., Xu H. T., Liu W. Y. et Lin B. C. (2007) Periaqueductal gray knockdown of V2, not V1a and V1b receptor influences nociception in the rat. yj6676@yahoo.com. *Neurosci.Res.* 57:104-111.

Yang, L., Zhang F. X., Huang F., Lu Y. J., Li G. D., Bao L., Xiao H. S. et Zhang X. (2004) Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord. *Eur.J.Neurosci.* 19:871-883.

Zamore, P. D., Tuschl T., Sharp P. A. et Bartel D. P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25-33.

Zender, L., Hutker S., Liedtke C., Tillmann H. L., Zender S., Mundt B., Waltemathe M., Gosling T., Flemming P., Malek N. P., Trautwein C., Manns M. P., Kuhnle F. et Kubicka S. (2003) Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100:7797-7802.

Zhang, X., Bao L., Xu Z. Q., Diez M., Frey P. et Hokfelt T. (1996) Peripheral axotomy induces increased expression of neurotensin in large neurons in rat lumbar dorsal root ganglia. *Neurosci.Res.* 25:359-369.

Zuhorn, I. S. et Hoekstra D. (2002) On the mechanism of cationic amphiphile-mediated transfection. To fuse or not to fuse: is that the question? *J.Membr.Biol.* 189:167-179.