

## NOUVELLE

### Ribozymes StitchR, ciseaux moléculaires et couture d'ARN

Victorien Arnaud<sup>1</sup>, Jean-Christophe Pagès<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unité mixte de recherche RESTORE (UMR 5070), CNRS, Inserm, Établissement français du sang (EFS), École nationale vétérinaire de Toulouse (ENVT), Université de Toulouse, Toulouse, France.

<sup>2</sup>Plateforme Éthique et biosciences, Génotoul Societal, Université de Toulouse et CHU de Toulouse, Toulouse, France. [victorien.arnaud@inserm.fr](mailto:victorien.arnaud@inserm.fr)

► En 1981, une découverte majeure a transformé notre regard sur l'évolution moléculaire du monde vivant. Jusqu'alors, la biologie des ARN cellulaires était centrée sur les ARN messagers (ARNm), principalement considérés comme des intermédiaires entre l'ADN, support du patrimoine génétique, et la synthèse des protéines, molécules effectrices des fonctions cellulaires. En 1981, Thomas Robert Cech et son équipe identifient la première des propriétés catalytiques de l'ARN, même si ce type d'activité avait été suspecté dès les années 1960. Chez le protozoaire *Tetrahymena thermophila*, ils découvrent qu'une séquence d'ARN d'intron du groupe I porte une activité enzymatique d'auto-épissage. L'étude mécanistique montre que ce sont des séquences d'ARN qui catalysent la réaction, sans l'intervention de protéines [1]. Ce constat fait émerger le concept de ribozyme, ARN doté de propriétés de catalyse enzymatique intrinsèque : une découverte récompensée par le prix Nobel de chimie en 1989.

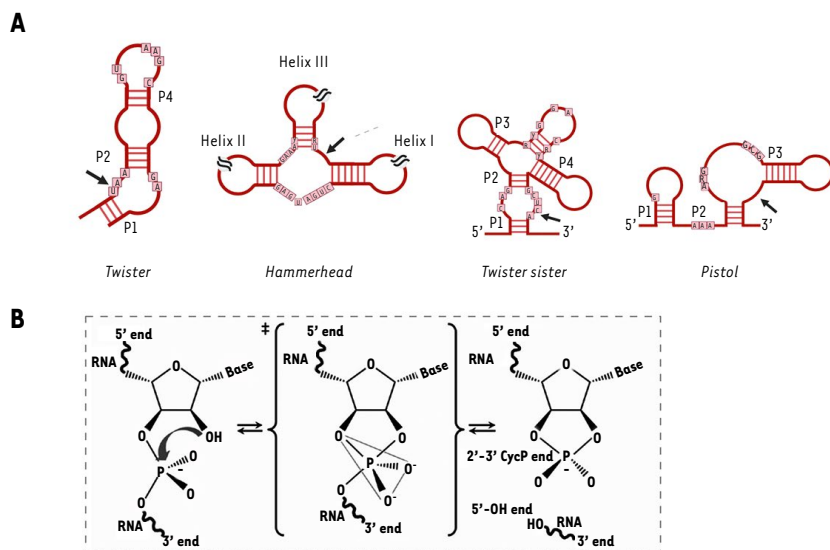
Par la suite, de nombreuses autres activités catalytiques des ARN ont été mises en évidence, incluant la formation des liaisons peptidiques par les ARN ribosomiques (ARNr), la maturation des ARN de transfert (ARNt) et l'épissage des ARNm. Toutes ces fonctions étayaient l'hypothèse d'un monde prébiotique dérivé de l'ARN, portant à la fois l'information génétique et la capacité de catalyse enzymatique, une condition essentielle des activités métaboliques des êtres vivants [2]. Parmi les ribozymes, une catégorie particulière est celle des ribozymes auto-clivants.

#### Les ribozymes auto-clivants : diversité et origines

Les premiers furent découverts en 1986-1987 : les ribozymes *Hammerhead*. Identifiés chez des virus satellites de plantes (virus à ARN circulaire et viroïdes), ces ribozymes présentent une capacité de clivage spécifique de leur ARN génomique par une réaction de transestérification (Figure 1). Ce clivage produit des extrémités 5'-OH et 2'3'-cP (2'3'-cyclic

*phosphate*) caractéristiques de cette activité. Le nom *Hammerhead* de ces ribozymes provient de leur structure tridimensionnelle, qui mime la forme d'une tête de requin-marteau. Notons que cette structure 3D a été très conservée au cours de l'évolution, et est essentielle à l'activité catalytique [3, 4] (Figure 1).

Depuis lors, onze classes de ribozymes auto-clivants ont été identifiées. Les *Hammerhead* (1986) donc, les *Hairpin* (1986), les ribozymes du virus de l'hépatite delta et *varkud satellite* (1988 et 1990), *glmS* (2004), *Vg1* (2008), *Twister* (2014), *Twister sister*, *Hatchet* et *Pistol* (2015), *B2(n)* (2020), *hovlinc* (2021) et *Obelisk* (2024). Ces molécules ont des structures primaires et tridimensionnelles différentes, tout en ayant la caractéristique commune de former des segments en hélice, reliés par des boucles (souvent conservées), par des interactions internes du type Watson-Crick stabilisant les structures tridimensionnelles liées à la formation d'un site catalytique [5] (Figure 1).



**Figure 1. A. Représentation schématique des structures secondaires des ribozymes *Twister*, *Hammerhead* et *Pistol*.** Le ribozyme *Twister* (en haut à gauche) est composé de trois tiges très conservées (P1, P2 et P4). Le ribozyme *Pistol* présente une architecture comprenant trois tiges (P1, P2, P3). Le ribozyme *Hammerhead*, présente une architecture en tête de requin marteau avec trois hélices (I, II, III). Les sites de clivage sont indiqués par des flèches, et les nucléotides très conservés sont affichés (A, U, G, C). B. L'encart illustre les étapes du mécanisme catalytique, notamment la formation d'intermédiaires cycliques et la libération des produits de clivage.

La précision de l'auto-clivage catalysé par les ribozymes *Hammerhead* a été mise à profit par les chercheurs pour la production de virus à ARN [6], et plus récemment pour des applications de thérapie génique.

### StitchR, outil de trans-ligation

Une utilisation élégante des ribozymes comme outils moléculaires a été publiée dans la revue *Science* [7]. L'objectif de ces chercheurs était de trouver le moyen de transférer un grand ADN complémentaire (ADNc) dont la taille dépasse les capacités d'incorporation des vecteurs viraux. Pour l'atteindre, ils ont développé un outil reposant sur la catalyse d'une trans-ligation de deux fragments d'ARN transcrits depuis deux unités séparées afin de reformer un long transcrite comportant un cadre de lecture complet. Par l'utilisation astucieuse de deux ribozymes,

leur étude valide le principe pour plusieurs transcrits, dont celui de la dystrophine.

En thérapie génique, et particulièrement dans le cas où le transfert est effectué par les vecteurs viraux, l'un des principaux obstacles est la taille de l'information génétique que l'on peut transférer, notamment du fait de contraintes liées à l'encapsulation des génomes recombinants dans la particule virale.

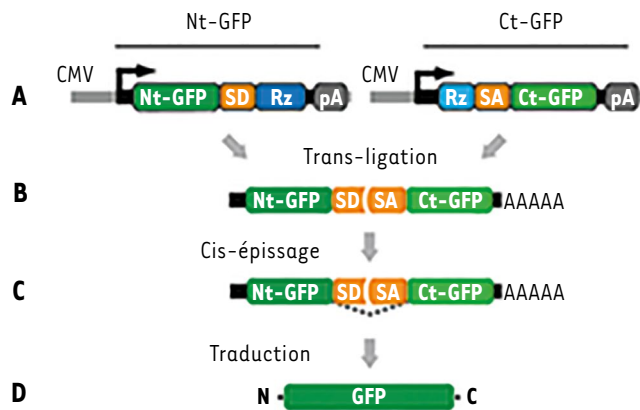
Les virus adéno-associés (*adeno-associated virus*, AAV) offrent l'intérêt d'un tropisme en partie adaptable par le choix de leur capsid, soit parmi les sérotypes naturels, soit après ingénierie [8]. En dépit de l'absence d'intégration de la séquence transduite dans le génome de la cellule cible, ils permettent une expression prolongée *in vivo* dans les tissus différenciés. Néanmoins, la taille des transgènes est une contrainte, puisque les vecteurs AAV ne

peuvent encapsider qu'une séquence d'ADN simple brin d'une taille maximale de 4700 nucléotides, limitant leur utilisation au transfert de gènes codant des protéines de petite taille. Pour contrecarrer cette limitation, plusieurs alternatives ont été développées : l'utilisation thérapeutique d'isoformes protéiques de taille réduite (e.g., mini- ou micro-dystrophines), ou la transduction simultanée par deux AAV recombinants (AAVr), chacun portant une partie de l'information génétique. Dans cette dernière configuration, il est attendu qu'une recombinaison entre les ADN des deux vecteurs ainsi que l'épissage du transcrite de cet ADN recombiné permettent la traduction du transcrite épissé en une protéine fonctionnelle [14] (→).

(→ Voir m/s n° 12, 2019, page 1213.)  
Néanmoins, cette approche produit de nombreux artefacts de recombinaison, et des protéines tronquées non fonctionnelles. Il est donc difficile de prédire son efficacité pour une utilisation médicale.

L'approche développée dans l'article de *Science* vise à substituer à ces recombinaisons complexes une trans-ligation entre deux ARN, orientée par la structure chimique 5'-OH et 2'3'-cP de leurs extrémités. Pour la valider, les chercheurs ont produit plusieurs versions d'un nouveau système, appelé StitchR, structuré pour réaliser la trans-ligation de fragments d'ARNm.

Pour une preuve de concept, les chercheurs ont utilisé deux plasmides distincts contenant des fragments non chevauchants du gène de la GFP (*green fluorescent protein*) : un plasmide pour la synthèse d'un ARN contenant la séquence nucléotidique codant la partie N-terminale de la protéine (Nt-GFP), un site donneur d'épissage associé au ribozyme du virus de l'hépatite D en 3' et un signal de polyadénylation ; et un second plasmide pour la synthèse d'un ARN portant un ribozyme *Hammerhead* en 5', un site accepteur d'épissage, puis la séquence nucléotidique codant



**Figure 2. A. Schéma des constructions d'expression sous le contrôle du promoteur CMV.** La construction Nt-GFP contient la partie N-terminale de la *green fluorescent protein* (Nt-GFP), un site donneur d'épissage (SD), un ribozyme (Rz) et un signal de polyadénylation (pA). La construction Ct-GFP contient un ribozyme (Rz), un site accepteur d'épissage (SA), la partie C-terminale de la GFP (Ct-GFP) et un signal de polyadénylation. **B. Trans-ligation.** Après transcription, les deux ARN messagers (ARNm) s'associent pour constituer un ARNm hybride contenant Nt-GFP, SD-SA et Ct-GFP. **C. Cis-épissage.** L'épissage de l'ARNm élimine la séquence SD-SA, produisant un ARNm codant la protéine GFP complète. **D. Traduction.** L'ARNm mature est traduit en une protéine GFP fonctionnelle, permettant la détection du signal fluorescent [7].

la partie complémentaire C-terminale de la protéine (Ct-GFP) et un signal de polyadénylation. La cotransfection de cellules de la lignée HEK293T avec ces deux vecteurs plasmidiques a permis la reconstitution du cadre de lecture complet du gène de la GFP par trans-ligation des deux ARNm « partiels » (Figure 2). La ligation des deux fragments d'ARN autoclivés en 3' et 5' implique une ligase physiologique, RtcB (*RNA 2',3'-cyclic phosphate and 5'-OH ligase*), dont il existe des formes nucléaires et cytoplasmiques qui catalysent spécifiquement la liaison covalente d'un ARN 5'OH à un ARN portant une extrémité 2'3'-cP. Cette activité ligase cellulaire est présente dans une grande variété d'organismes vivants, y compris les archées, les algues et les animaux, alors qu'elle est absente dans les champignons. Chez *Homo sapiens*, elle a été impliquée dans la maturation des ARNt, ainsi que dans celle de l'ARNm du gène *XBPI* [9]. Le mécanisme catalytique de la ligation d'une extrémité 2'3'-cP d'un ARN

à l'extrémité 5' OH d'un autre ARN par la ligase RtcB est connu. L'enzyme se lie à une molécule de GTP, qui est hydrolysée en GMP, formant un intermédiaire 3'-P-P-GMP-RtcB, ce qui facilite la liaison à l'extrémité 5'-OH de l'ARN partenaire, et catalyse la formation de la liaison phosphodiester avec un ARN 2'3'-cP. La structure tridimensionnelle de la RtcB est très conservée entre les organismes vivants, suggérant un rôle fondamental de ses activités et indirectement des ribozymes. Proche des métalloenzymes, la RtcB a longtemps été considérée comme telle du fait de la nécessité de deux ions divalents dans la catalyse de la réaction de ligation [10]. Les chercheurs ont ensuite développé leur stratégie afin d'accéder à un haut rendement de trans-ligation, dont ils ont testé l'efficacité à l'aide de plusieurs combinaisons de ribozymes. Ils montrent que le ribozyme *Twister* est plus efficace pour la coupure en 3', tandis que le ribozyme *Hammerhead* modifié RzB est plus efficace en 5'.

Cette combinaison *Twister*-RzB (*StitchR 2.0*) permet d'augmenter d'environ huit fois l'activité luciférase, pour un système de vecteurs identiques à ceux décrits précédemment (mais contenant deux fragments d'un gène codant la luciférase), par rapport au couple de ribozymes initial.

Pour optimiser davantage l'expression du transcrite réassemblé, un intron est introduit dans les constructions codant la GFP ou la luciférase. Cet intron scindé facilite l'épissage par le spliceosome, et élimine les séquences résiduelles des ribozymes (système « sans cicatrices », ou *scarless*). L'évolution finale a consisté à optimiser le choix des ribozymes adjoints aux segments codant les deux fragments de la protéine à synthétiser. L'utilisation du ribozyme *Twister* pour les fragments N-terminal et C-terminal produit la plus grande augmentation de l'activité luciférase (*i.e.*, environ 75 % de l'activité d'une luciférase codée par un ADNc contenant la totalité de la séquence codante). Cette nouvelle version de *StitchR* est environ 900 fois plus efficace que *StitchR 1.0*. Enfin, *StitchR 4.0* intègre les optimisations des ribozymes et de l'épissage intronique, maximisant ainsi l'efficacité de la trans-ligation des ARNm et celle de la traduction en protéine.

### Application du système *StitchR* à la thérapie génique

Les évolutions de *StitchR* ont alors permis de tester cette innovation dans une approche de modèle thérapeutique et en utilisant deux vecteurs AAV. L'équipe a scindé la séquence nucléotidique codant la GFP en deux fragments, chacun intégrant une des deux parties du système *StitchR 3.0*. Chacune de ces constructions a été encapsidée dans un vecteur AAV. La fluorescence verte qui a été observée après la double transduction de cellules HEK293 a indiqué que la séquence codante complète pouvait être



reconstituée par la trans-ligation des deux ARNm partiels issus de la transcription des fragments portés par les deux AAVr. L'efficacité de la technique a été confirmée *in vivo* par coinjection des deux vecteurs AAV recombinants à des souris : cinq mois après l'injection, la fluorescence verte de la GFP était toujours détectable.

La validation de la technique dans un contexte de thérapie génique a été obtenue avec la reconstitution de la séquence codante entière du transcrit permettant la synthèse de la dysferline, une protéine dont la perte de fonction est à l'origine de trois formes majeures de dystrophie musculaire. Pour cela, deux vecteurs AAV StitchR 4.0 ont été conçus pour la trans-ligation des ARNm et la reconstitution de cette séquence codante, dont la taille de 6 240 pb dépasse la capacité d'encapsulation d'un AAV unique, en particulier avec la nécessaire présence d'une séquence promotrice. Les deux vecteurs recombinants, dérivés de AAV9 pour favoriser un tropisme musculaire, ont été administrés à des souris invalidées pour le gène de la dysferline. L'analyse des tissus a révélé une abondance de la dysferline comparable à celle de souris témoins de génotype « sauvage ».

Une approche similaire a ensuite été utilisée pour reconstituer l'une des versions courtes et fonctionnelles de la dystrophine, la dystrophine DH2-R15. Les formes mutées non fonctionnelles de la dystrophine sont associées à la myopathie de Duchenne. Des souris invalidées pour le gène de la dystrophine ont reçu les AAV9 DH2-R15 (StitchR 4.0). L'analyse par *western blot* et par densitométrie a montré que le transfert de séquences géniques dont la taille cumulée d'environ 7 kb a été répartie entre les deux AAVr permet la reconstitution de la dystrophine DH2-R15.

La quantité de cette protéine thérapeutique atteint jusqu'à 94 % de celle de la forme endogène (non mutée) chez des souris de génotype « sauvage » dans le muscle quadriceps, 75 % dans le muscle cardiaque, et 42 % dans les muscles abdominaux.

Pour que le système StitchR, après cette preuve de concept prometteuse, devienne un outil pour la thérapie génique utilisant des vecteurs AAV, il reste à compléter ces études chez la souris par d'autres études sur des modèles plus pertinents d'un point de vue physiopathologique (notamment grâce à un modèle canin de la myopathie de Duchenne, présentant des symptômes plus proches de ceux de la maladie humaine). Dans le cas de la myopathie de Duchenne, le succès des systèmes « conventionnels » de transfert de séquences nucléotidiques courtes codant une microdystrophine réduit l'intérêt de l'utilisation du système StitchR [11]. Toutefois, pour nombre d'autres maladies génétiques, les stratégies de thérapie génique pourront nécessiter le transfert de longues séquences nucléotidiques, non remplaçable par un transfert de séquences codantes plus courtes ou par une approche différente fondée sur le « saut d'exon » (*exon-skipping*) [12]. Le trans-épissage serait alors une solution. D'autres applications du système StitchR sont envisageables, notamment pour pallier l'impossibilité de produire des AAVr codant des protéines toxiques. Séparer la séquence codant une telle protéine en deux fragments « non toxiques » inclus dans deux vecteurs distincts permettrait une production séparée des AAVr respectifs.

Enfin, sur un plan mécanistique, il importe de comprendre quelle voie utilisent les molécules d'ARN produites par

le système StitchR pour permettre leur trans-épissage. Ces molécules issues des vecteurs pourraient induire un risque de formation de protéines de fusion si elles étaient trans-épissées avec un transcrit cellulaire. Sur le plan physiologique, une piste récemment identifiée serait le mécanisme de « SOS épissage » qui met en œuvre la RtcB [13]. ♦

### StitchR ribozymes: new molecular scissors applied to RNA-shaping

#### RÉFÉRENCES

1. Cech TR, Zaugg AJ, Grabowski PJ. *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 1981 ; 27 : 487-6.
2. Robertson MP, Joyce GF. The origins of the RNA world. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012 ; 4 : a003608.
3. De la Peña M, Cervera A. Circular RNAs with hammerhead ribozymes encoded in eukaryotic genomes: The enemy at home. *RNA Biology* 2017 ; 14 : 985-91.
4. De la Peña M, García-Robles I, Cervera A. The Hammerhead ribozyme: A long history for a short RNA. *Molecules* 2017 ; 22 : 78.
5. Kläuge D, Müller E, Hartig JS. A comparative survey of the influence of small self-cleaving ribozymes on gene expression in human cell culture. *RNA Biology* 2024 ; 21 : 1-11.
6. Heller T, Saito S, Auerbach J, et al. An *in vitro* model of hepatitis C virion production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 2579-83.
7. Lindley SR, Subbaiah KCV, Priyanka F, et al. Ribozyme-activated mRNA trans-ligation enables large gene delivery to treat muscular dystrophies. *Science* 2024 ; 386 : 762-7.
8. Wang J-H, Gessler DJ, Zhan W, et al. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Sig Transduct Target Ther* 2024 ; 9 : 1-33.
9. Ahammed KS, van Hoof A. Fungi of the order *Mucorales* express a "sealing-only" tRNA ligase. *RNA* 2024 ; 30 : 354-66.
10. Moncan M, Rakhsh-Khorshid H, Eriksson LA, et al. Insights into the structure and function of the RNA ligase RtcB. *Cell Mol Life Sci* 2023 ; 80 : 352.
11. Duan D. Systemic AAV micro-dystrophin gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 2018 ; 26 : 2337-56.
12. Leckie J, Rodriguez SH, Krahn M, et al. Analysis of exon skipping applicability for dysferlinopathies. *Cells* 2025 ; 14 : 177.
13. Zhao LW, Nardone C, Paulo JA, et al. An RNA splicing system that excises transposons from animal mRNAs. *BioRxiv* 2025 ; doi : 10.1101/2025.02.14.638102.
14. Hardelin JP, Safieddine S. Vers une thérapie génique de certaines surdités congénitales ? *Med Sci (Paris)* 2019 ; 35 : 1213-5.