

Thérapie Génique

L'éponge à protons : un moyen d'entrer dans une cellule auquel les virus n'ont pas pensé

La force de la thérapie génique est également son point faible : l'ADN est une « pro-drogue », et la cascade d'événements allant du gène à la synthèse en grand nombre du véritable effecteur thérapeutique (la protéine) a son origine dans le noyau. Pour y parvenir, l'acide nucléique exogène requiert un vecteur, généralement un virus recombinant [1]. En effet, l'évolution a conféré aux virus des moyens d'effraction sophistiqués [2] leur permettant, par exemple, de pénétrer dans le cytoplasme d'une cellule par rupture de la membrane plasmique, voire pour certains d'atteindre le noyau grâce à des protéines comportant un signal de localisation nucléaire. La rupture membranaire peut se produire directement à la surface de la cellule, ou être consécutive à l'endocytose du virus; dans tous les cas, la protéine fusiogène responsable est « informée » par la liaison au récepteur cellulaire ou l'acidification de l'endosome, et subit un réarrangement conformationnel majeur qui l'active. A côté d'une séquence d'événements moléculaires aussi complexes, un chimiste semble bien démuné. Pourtant des vecteurs synthétiques de transfert de gènes, même primitifs, seraient très utiles à la thérapie génique dès lors qu'ils seraient suffisamment efficaces (cet adjectif, qui qualifie paraît-il la puissance du moteur dans la notice technique de *Rolls-Royce*, signifie l'adéquation des performances à l'utilisation). Ce critère est encore loin d'être satisfait, comme le montrent les tentatives de thérapie génique de la mucoviscidose ou du mélanome conduites récemment en Angleterre et aux États-Unis.

La chimie n'a pas la contrainte de répliquer d'un système vivant, et peut donc explorer une palette infiniment plus grande de molécules. Avec un peu d'imagination et beaucoup de tâtonnements en guise d'évolution, deux types de vecteurs synthétiques ont été développés au cours de la dernière décennie. Ces composés, lipides [3] ou polymères [4], sont de nature cationique comme leurs ancêtres (phosphate de calcium, DEAE-dextran). Leur interaction ionique avec l'ADN provoque la condensation de ce dernier en des particules sub-micrométriques. Pour un lipide cationique en excès de charge électrostatique par rapport aux phosphates de l'ADN, les particules nucléolipidiques résultantes se fixent à la surface de la cellule, également par interaction ionique, et y pénètrent par endocytose spontanée. Les lipides cationiques présentent des efficacités de transfection qui varient beaucoup avec la structure chimique du vecteur, mais aussi avec le type cellulaire. Néanmoins, une classe particulière de vecteurs, les lipopolyamines, est toujours dans le peloton de tête [3, 5]. Cette propriété est liée intrinsèquement à la tête polaire [6], et ni l'adjonction d'un lipopeptide fusiogène ni celle d'un signal de localisation nucléaire n'accroît davantage cette efficacité [7]. Il était donc bien tentant d'attribuer toutes ces propriétés intéressantes à la tête polyamine. La détermination potentiométrique des équilibres de protonation des fonctions amine montre qu'à pH physiologique seuls trois des quatre atomes d'azote sont sous forme cationique

(figure 1). Le pKa de la dernière fonction amine est de 5,5, à mi-chemin entre les pH extracellulaire et intralysosomal; de là à lui faire jouer le rôle d'un tampon...

A côté des lipides décrits ci-dessus, les polymères cationiques comme la polylysine sont inefficaces, sauf s'ils sont conjugués à des ligands provoquant l'endocytose relayée par un récepteur présent à la surface cellulaire [4]. Même dans ces conditions, le niveau de transfection ne devient comparable à celui des lipopolyamines qu'après couplage du vecteur à des particules adénovirales défectueuses qui rompent efficacement les endosomes [8]; dans ce dernier cas, malheureusement, le bénéfice du ciblage n'est plus évident. Récemment, les polymères cationiques aussi ont trouvé leur champion dans les dendrimères polyamidoamines [9], qui sont des macromolécules quasi-sphériques dont la surface comporte une multitude de fonctions amine. A nouveau, la totalité des fonctions amine d'un dendrimère n'est pas protonée à pH physiologique...

Ces constatations, faites indifféremment sur un lipide ou un polymère, conduisent à la question suivante: y aurait-il un lien causal entre une réserve de pouvoir tampon du vecteur et une efficacité de transfection accrue? En suivant ce fil directeur, nous avons imaginé diverses macromolécules possédant de très grandes densités de fonctions amine. En effet, de tels composés polycationiques devraient rester capables de condenser l'ADN mais, du fait des répulsions prévisibles entre de nombreuses

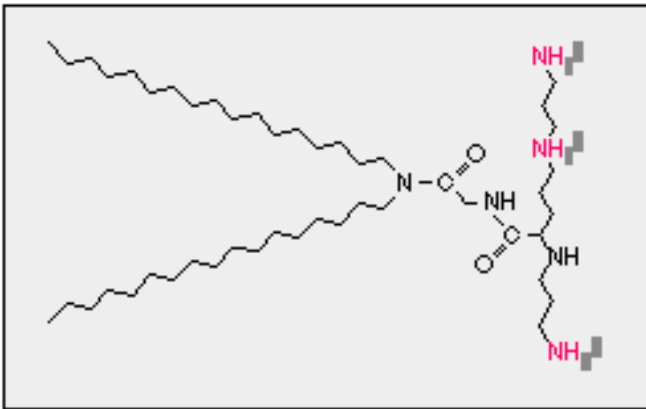


Figure 1. **Structure de la lipopolyamine Transfectam.** A pH neutre, seuls trois des quatre atomes d'azote sont sous forme cationique. La dernière fonction amine se protone entre pH5 et pH6.

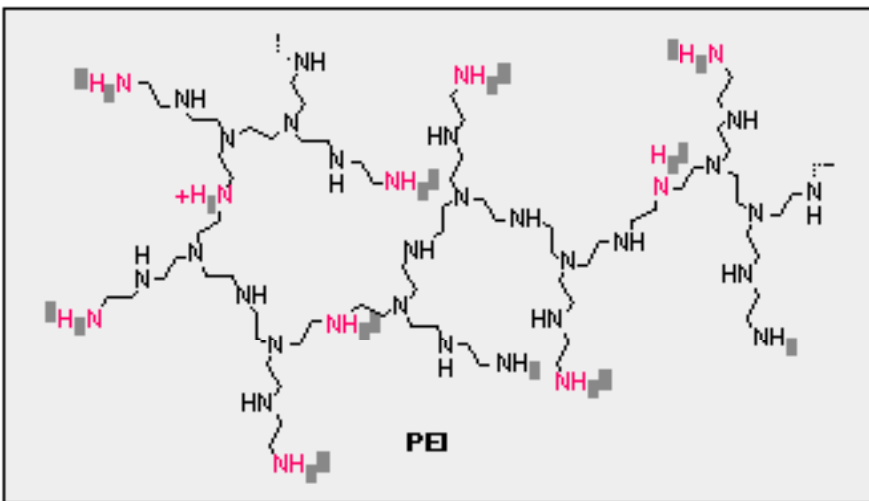
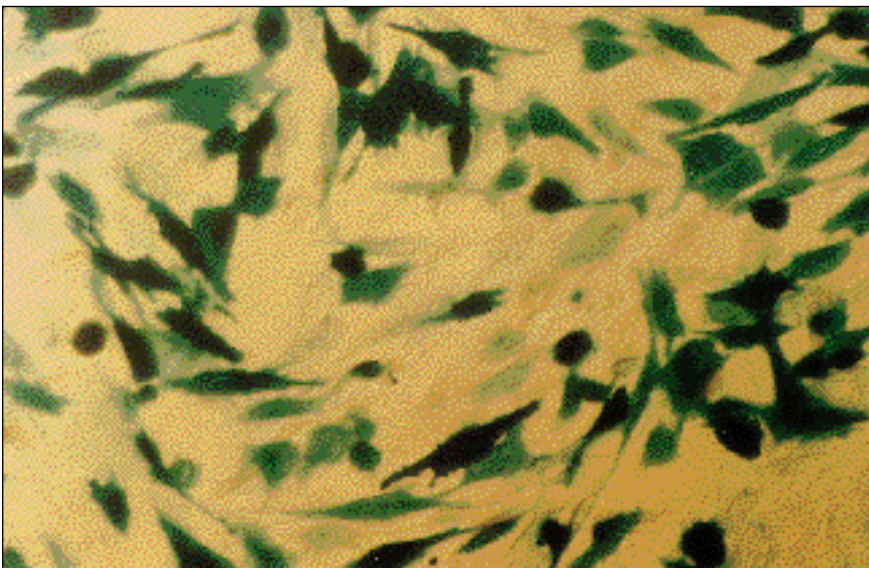


Figure 2. **Structure de la polyéthylèneimine à pH neutre.** Un chaînon sur trois est un atome d'azote; la protonation passe de 20 % à 40 % entre pH 7 et pH 5.



charges voisines de même signe, ils ne devraient pas être totalement protonés à pH physiologique. Cauchemar de chimiste: le meilleur candidat potentiel n'était même pas à synthétiser! En effet, le polymère commercial polyéthylèneimine (PEI *figure 2*) a un chaînon sur trois qui est un atome d'azote, et passe de 20 % à 45 % de protonation entre pH 7 et pH 5. C'est, de surcroît, un composé connu depuis un demi-siècle, et dont l'innocuité est reflétée par une utilisation intensive dans l'environnement humain (purification d'eau potable, extraction de minerais, shampoings, etc.). L'efficacité de transfection de ce polymère a été comparée à celle des lipopolyamines sur une grande variété de lignées cellulaires et de cellules primaires, et même *in vivo*. Les résultats très prometteurs [10] (*figure 3*) vont insuffler une deuxième jeunesse à cette molécule simple, qui est au moins aussi performante que les meilleurs vecteurs de synthèse actuels.

Figure 3. **Transfert du gène codant pour la β -galactosidase dans des fibroblastes murins 3T3 à l'aide de polyéthylèneimine** (Cliché O. Bous-sif, M.A. Zauta).

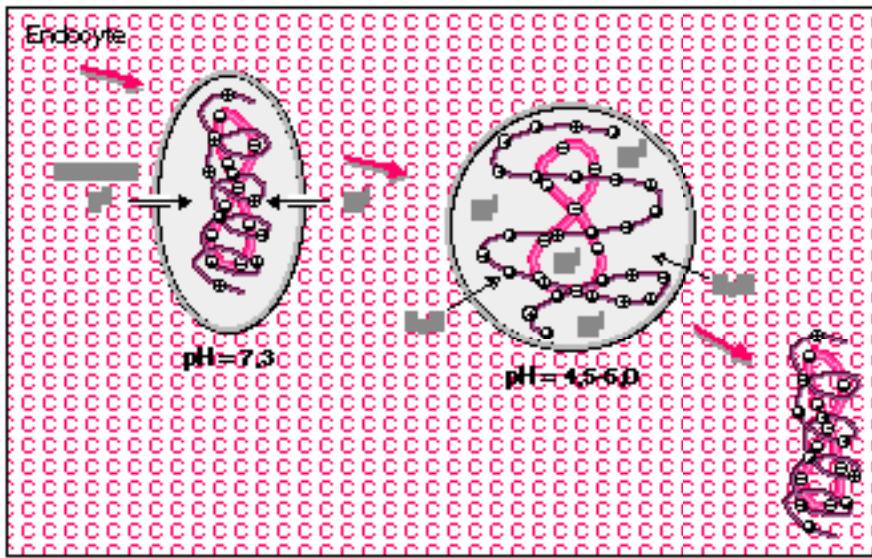


Figure 4. **Représentation schématisée de la rupture d'un endosome par l'éponge moléculaire.** L'accumulation des ions H^+ et Cl^- provoque le gonflement du polymère et la lyse osmotique de la vésicule.

RÉFÉRENCES

1. Kahn A. *Thérapie génique: l'ADN médical.* Paris : John Libbey Eurotext, 1993.
2. Fields BN, Knipe DM. *Virology.* New York: Raven Press, 1990.
3. Behr JP. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles; prospects for gene therapy. *Bioconjugate Chem* 1994; 5: 382-9.
4. Cotten M, Wagner E. Non-viral approaches to gene therapy. *Curr Op Biotech* 1993; 4: 705-10.
5. Hawley-Nelson P, Ciccarone V, Gebeyehu G, Jesse J, Felgner PL. Lipofectamine reagent: A new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. *Focus* 1993; 15: 73-9.
6. Remy JS, Sirlin C, Vierling P, Behr JP. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjugate Chem* 1994; 5: 647-54.
7. Remy JS, Kichler A, Mordvinov V, Schuber F, Behr JP. Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage towards artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1744-8.
8. Veelken H, Jesuiter H, Mackensen A, Kulmburg P, Schultze J, Rosenthal F, Mertelsmann R, Lindemann A. Primary fibroblasts from human adults as target cells for *ex vivo* transfection and gene therapy. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 1203-10.
9. Haensler J, Szoka FC. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate Chem* 1993; 4: 372-9.
10. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7297-301.
11. Nelson N. Structure and pharmacology of the proton ATPases. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 71-5.

Jean-Paul Behr

Laboratoire de chimie génétique, faculté de pharmacie de Strasbourg, 67401 Illkirch Cedex, France.

TIRÉS À PART

J.P. Behr.

La séquence d'événements sur laquelle nous fondons ces propriétés est schématisée sur la figure 4. Les particules de polycation/ADN pénètrent dans la cellule par endocytose spontanée. La nature même du mécanisme (interaction ionique sur toute la surface de la particule) induit une concentration locale en PEI très élevée dans l'endosome. Au cours du trafic intracellulaire, le pouvoir tampon du vecteur va conduire indirectement à retarder l'action des nucléases lysosomales, dont l'efficacité est optimale à pH acide, mais il va également perturber profondément l'osmolarité des vésicules. En effet, l'accumulation massive de protons par l'ATPase vésiculaire n'est pas électrogène car elle est couplée à l'influx d'anions chlorure [11]. Ce phénomène va donc se traduire par une augmentation importante de la concentration ionique dans l'endosome, un gonflement du polymère par répulsion interne de charge, et l'entrée d'eau par osmose. Il serait bien étonnant que l'endosome résiste longtemps à ce traitement. Compte tenu du profil de protonation, environ un tiers des atomes d'azote participent au gonflement, ce qui fait de ce polymère une véritable éponge.

Le fait remarquable dans ce mécanisme, par ailleurs plutôt primitif à côté des solutions trouvées par les virus, est qu'il conduit d'emblée à des niveaux de transfert de gène élevés. La polyéthylèneimine constitue donc, telle quelle, un vecteur prometteur pour la thérapie génique, et une structure de base idéale pour la conception de vecteurs plus sophistiqués incorporant des fonctions supplémentaires ■