



***L* la représentation des séquences des ADN plasmidiques utilisés en thérapie génique à l'aide des symboles A, T, G, C est-elle satisfaisante ?**

L'utilisation d'ADN d'origine plasmidique apparaît aujourd'hui comme une alternative intéressante aux vecteurs viraux actuellement développés dans le cadre de la vaccination ou de la thérapie génique. C'est ainsi que plusieurs résultats récents ont permis de valider le concept de vaccination génique à l'aide d'ADN « nu » tant chez l'animal que chez l'homme [1-3]. Par ailleurs l'augmentation de l'efficacité du transfert d'ADN plasmidique observée *in vivo* grâce à l'application d'impulsions électriques rend envisageable l'utilisation de cet électrotransfert de gènes dans le cadre plus vaste de la thérapie génique [4-6]. L'utilisation d'un ADN non viral dans ces différentes approches est d'autant plus attirante qu'elle présente en plus de sa simplicité méthodologique l'avantage d'éviter l'introduction de protéines virales immunogènes dans l'organisme. Toutefois l'utilisation d'un ADN en thérapie humaine nécessite un descriptif précis de sa composition chimique, une exigence qui se retrouve d'ailleurs pour tout agent thérapeutique nouveau. Le problème posé au travers de cette note est celui de l'existence d'une divergence

entre la séquence nucléotidique des plasmides représentée à l'aide des symboles A, T, G, C et la séquence nucléotidique réellement injectée dans l'organisme.

L'ADN d'*E. Coli* contient deux bases modifiées, la 6-méthyladénine et la 5-méthylcytosine. Elles sont la conséquence de l'existence chez les organismes procaryotes de systèmes de modification de l'ADN comme les systèmes Dam et Dcm d'*E. Coli* [7]. Contrairement aux eucaryotes chez lesquels seules certaines cytosines des dinucléotides -CG- sont méthylées, les activités Dam et Dcm bactériennes méthylent systématiquement le résidu adénine de toutes les séquences GATC et la cytosine interne de toutes les séquences CC(A/T)GG. C'est ainsi qu'une séquence d'ADN transitant dans une bactérie verra sa séquence transformée par les systèmes de modification bactériens. Les génomes bactériens et eucaryotes portent donc l'emprunte de leurs origines respectives au travers de leur différents profils de méthylation. Il apparaît donc que tout ADN plasmidique préparé dans une souche (*dam⁺*, *dcm⁺*) aura une séquence nucléotidique réelle différente de sa séquence symbolique-

ment représentée à l'aide des lettres A, T, G, C. Le peu d'intérêt suscité par le phénomène de modification bactérien dans le contexte de la thérapie génique est vraisemblablement lié au fait que la méthylation des résidus adénine et cytosine est un phénomène épigénétique qui n'affecte pas le sens du message génétique véhiculé par une séquence d'ADN codante. Cette neutralité des méthylations vis-à-vis du code génétique ne doit pas cependant occulter le fait que l'injection d'un plasmide chez l'homme ne se limite pas au transfert d'une seule information génétique. En effet, une séquence d'ADN d'origine bactérienne injectée dans un organisme est potentiellement porteuse de plusieurs niveaux d'information qui ne seront pas exclusivement lus au travers du code génétique. C'est ainsi que coexistent aux côtés du message génétique, des informations chimiques, biophysiques, biochimiques et biologiques qui elles, seront affectées par le phénomène de modification bactérien [8]. La déstabilisation de la double hélice d'ADN consécutive à la méthylation des séquences GATC est un exemple de modification biophysique dont les conséquences éventuelles sur la

transcription mériteraient d'être étudiées [9]. Au niveau biochimique, la méthylation des séquences GATC et CC(A/T)GG entraîne une modification des interactions entre l'ADN et les protéines. L'influence de ces méthylations sur les interactions entre ADN plasmidique et histones ou facteurs de transcriptions eucaryotes mériteraient d'être analysée en détail dans la mesure où des éléments artificiels de réponse à la progestérone ou aux glucocorticoïdes peuvent être créés par l'action du système de méthylation bactérien Dam [10]. Par ailleurs, l'observation chez *E. Coli* d'une fréquence de mutation élevée au niveau des cytosines méthylées se concrétisant par une conversion G:^mC → A:T [11] est aussi un élément à prendre en compte par son impact possible et prévisible au niveau de la séquence protéique recombinante. En effet, de telles mutations, même si elles n'affectent qu'un pourcentage minime des plasmides présents dans une préparation, pourraient néanmoins conférer un gain dominant de fonction aux protéines recombinantes concernées. Enfin les plasmides utilisés en thérapie génique véhiculent aussi une information biologique indépendante de toute séquence codante et induisant le déclenchement d'une réaction inflammatoire lorsque cet ADN d'origine bactérienne est injecté chez des mammifères. L'implication de la différence des profils de méthylation procaryotes et eucaryotes au niveau des dinucléotides CpG au cours de ce processus a été démontrée [12, 13]. La possibilité de voir les différences de méthylation des séquences GATC et CC(A/T)GG participer aussi à une réponse antimicrobienne ne peut ainsi pas être exclue. Un tel phénomène, dont l'intensité pourrait varier d'un plasmide à l'autre en fonction de la position et de la fréquence des motifs méthylés, pourrait être utilisé dans le cas de la vaccination génique mais pourrait se révéler particulièrement néfaste voire dangereux dans les autres approches de thérapie génique. Ces différents points illustrent le fait que les conséquences potentielles de l'ignorance du système de modification bactérien dans

les approches thérapeutiques faisant appel à l'ADN non viral dépassent largement le cadre du seul formalisme chimique. La présence d'un profil de méthylation bactérien devrait ainsi être un des paramètres à prendre en compte lors de l'utilisation des ADN thérapeutiques et justifie à notre avis l'utilisation d'un code à six sigles incluant les symboles ^mA et ^mC dans la description des séquences plasmidiques.

L'utilisation d'ADN plasmidique est vraisemblablement appelée à se développer en thérapie humaine. Cependant l'information véhiculée par un ADN amplifié dans une bactérie ne se limite pas à un message lu exclusivement au travers du code génétique. La représentation des séquences d'ADN plasmidique à l'aide des symboles A, T, G, C, qui ne tient pas compte des systèmes de modification bactériens, induit une perte d'informations chimique, biochimique, biologique dont les conséquences éventuelles mériteraient d'être étudiées en détail pour chaque nouvel ADN thérapeutique. Dans la mesure où la méthylation par les enzymes Dam et Dcm est parfaitement prédictible, nous suggérons l'utilisation d'un code à six sigles incluant les symboles ^mA et ^mC dans le descriptif des ADN plasmidiques. Cette nouvelle représentation des séquences d'ADN plasmidique devrait faciliter l'intégration du phénomène de modification bactérien [14] dans les concepts utilisés en thérapie génique ■

Remerciements

Nous remercions la Ligue contre le Cancer pour son soutien financier.

RÉFÉRENCES

1. Xu L, Sanchez A, Yang ZY, *et al.* Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med* 1998 ; 4 : 37-42.
2. Huygen K, Content J, Denis O, *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* 1996 ; 2 : 893-8.

3. Wang R, Doolan DL, Le TP, *et al.* Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 1998 ; 282 : 476-80.

4. Mir LM, Bureau MF, Rangara R, Schwartz B, Scherman D. Long-term, high level *in vivo* gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *CR Acad Sci Paris* 1998 ; 321 : 893-9.

5. Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotech* 1998 ; 16 : 867-70.

6. Rols MP, Delteil C, Golzio M, Dumond P, Cros S, Teissie J. *In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotech* 1998 ; 16 : 168-71.

7. Palmer BR, Marinus MG. The dam and dcm strains of *Escherichia coli*: a review. *Gene* 1994 ; 143 : 1-12.

8. Berger F, Canova C, Benabid AL, Wion D. Are sequences of plasmid DNA used in gene therapy erroneous? *Nat Biotech* 1999 ; 17 : 517.

9. Barras F, Marinus MG. The great GATC: DNA methylation in *E. Coli*. *Trends Genet* 1989 ; 5 : 139-43.

10. Truss M, Bartsch J, Chalepakis G, Beato M. Artificial steroid response element generated by dam-methylation. *Nucleic Acids Res* 1992 ; 20 : 1483-6.

11. Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia Coli*. *Nature* 1978 ; 274 : 775-80.

12. Krieg AM, Yi AK, Matson S, *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995 ; 374 : 546-9.

13. Krieg AM. Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. *Trends Microbiol* 1996 ; 4 : 73-7.

14. Luria SE, Human ML. A non-hereditary, host-induced variation of bacterial viruses. *J Bacteriol* 1952 ; 64 : 557-69.

Isabelle Dupré

David Ratel

Jean-Michel Vicat

Michèle Lainé

François Berger

Alim-Louis Benabid

Didier Wion

Inserm U. 318, CHU Michallon, 38043 Grenoble Cedex 09, France.