

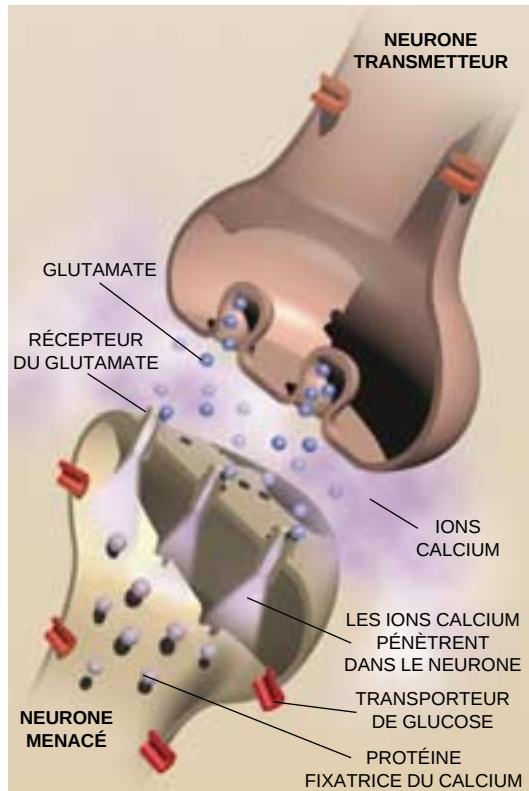
ment par le virus modifié. On ne sait pas prévoir le moment exact des crises d'épilepsie ou des accidents vasculaires cérébraux, mais, quelques heures après la crise, la thérapie génique protège encore les neurones.

Une autre forme de thérapie génique possible contre les attaques ou les traumatismes serait la désactivation des mécanismes d'apoptose (le suicide cellulaire). Howard Federoff et ses collègues de l'Université de Rochester, ainsi que Matthew Lawrence, dans notre équipe, ont introduit un gène inhibiteur de l'apoptose, *bcl-2*, dans des virus de l'herpès. Le traitement des cellules cérébrales de rats par ces vecteurs viraux protège contre les dégâts d'une crise, même lorsque le traitement commence après celle-ci.

Les neurobiologistes étudient également la prévention des maladies génétiques qui entraînent des altérations du métabolisme lipidique et qui conduisent à une accumulation létale de molécules de graisses dans le cerveau. À la recherche de thérapies géniques contre ces maladies, les biologistes ont produit des souris porteuses d'une mutation du gène qui code la bêta-glucuronidase. John Wolfe et ses collègues de l'Université de Pennsylvanie ont transplanté, chez une souris atteinte, des neurones fœtaux génétiquement modifiés pour fabriquer de la bêta-glucuronidase, et ils ont constaté que les implants supprimaient les lipides dévastateurs du cerveau de l'animal.

La fabrication des vecteurs viraux demeure difficile : quand on désactive trop le virus, il n'infecte plus suffisamment les neurones, mais, quand on le désactive trop peu, il endommage les neurones qu'il infecte. Aujourd'hui, tous les vecteurs viraux réalisés présentent l'un ou l'autre de ces défauts, et bien des perfectionnements seront nécessaires avant qu'on puisse tester en toute sécurité des thérapies géniques chez les personnes atteintes de maladies neurodégénératives.

De surcroît, le cerveau est enfermé dans la boîte crânienne, de sorte que l'injection d'un produit thérapeutique directement dans le tissu atteint est difficile. Lors des expériences sur les animaux, les neurobiologistes percent un orifice dans la boîte crânienne, afin d'in-



2. AU COURS D'UNE CRISE D'ÉPILEPSIE ou d'un accident vasculaire cérébral, un neuromédiateur (le glutamate) s'accumule excessivement (en bleu) dans la fente synaptique entre les neurones. Sur la cellule réceptrice (en bas), des molécules spécialisées, ou récepteurs de glutamate, permettent alors aux ions calcium (en violet) de pénétrer à l'intérieur de la cellule et d'y causer des dégâts irréversibles. Par thérapie génique, on voudrait augmenter la quantité de protéines fixant ces ions calcium (fixés, ils deviendraient inoffensifs) ou accroître le nombre de transporteurs de glucose, qui apporteraient alors au neurone menacé une énergie qui lui permettrait de résister aux lésions.

jecter le produit dans la partie du cerveau menacée ; chez l'homme, on cherche un traitement moins invasif. On pourrait injecter un virus par voie intraveineuse (si l'on mettait au point un virus qui limitait son action au tissu nerveux), mais le virus serait sans doute bloqué par la barrière hémato-encé-

phalique, ce réseau de capillaires qui ne laisse passer dans le tissu cérébral que les petites molécules.

D'autres obstacles existent. Si les vecteurs viraux atteignent le cerveau, seront-ils assez actifs ? Agiront-ils suffisamment longtemps ? Les biologistes devront améliorer le rayon d'action, l'efficacité et la persistance des modifications génétiques.

Les défis du cerveau

Quelles sont les possibilités réelles de la thérapie génique du cerveau ? Les travaux d'Anders Björklund et de ses collègues de l'Université de Lund en donnent un aperçu. Ces biologistes, les premiers à avoir exploré les méthodes de transplantation de neurones fœtaux, ont mis au point des greffons qui produisent de grandes quantités d'un facteur de croissance des nerfs. Ils ont greffé à des rats adultes quelques-unes de ces cellules transgéniques, en ciblant une région du cerveau essentielle pour l'apprentissage et la mémoire – région qui se dégrade lentement à mesure du vieillissement. Cette manipulation inverse le déclin des facultés cognitives chez les rats âgés.

Cette réussite laisse imaginer que la thérapie génique pourrait servir, non seulement à faire reculer la maladie, mais aussi à améliorer la mémoire et la coordination des personnes âgées. Les neurobiologistes auront beaucoup à faire avant qu'on puisse appliquer cette technique en gériatrie, mais, un jour, la thérapie génique constituera un outil médical efficace pour ralentir le vieillissement des cerveaux âgés.

Dora HO est biologiste et Robert SAPOLSKY est professeur de biologie et de neurosciences. Ils travaillent tous deux à l'Université Stanford.

M.J. DURING et al., *Long-Term Behavioral Recovery in Parkinsonian Rats by an HSV Vector Expressing Tyrosine Hydroxylase*, in *Science*, vol. 266, pp. 1399-1403, 25 novembre 1994.

Jack COHEN et Michael HOGAN, *Le blocage des gènes*, *Pour la Science*, février 1995.

D.Y. HO et al., *Use of Herpes Simplex Virus*

Vectors for Protection from Necrotic Neuron Death, in *Viral Vectors : Gene Therapy and Neuroscience Applications*, sous la direction de M. Kaplitt et A. Loewy, Academic Press, 1995.

D.J. FINK, N.A. DELUCA, W.F. GOINS et J.C. GLORIOSO, *Gene Transfer to Neurons Using Herpes Simplex Virus-Based Vectors*, in *Annual Review of Neuroscience*, vol. 19, pp. 245-287, 1996.

Moussa YOUSSEF et Peter RIEDERER, *La maladie de Parkinson*, *Pour la Science*, mars 1997.

Des pores artificiels dans les cellules

HAGAN BAYLEY

Les biologistes créent, dans la membrane cellulaire, des pores artificiels qui contrôleront l'entrée des médicaments dans les cellules.

La membrane externe d'une cellule n'est pas une simple enveloppe : c'est une sentinelle moléculaire qui contrôle tout ce qui pénètre et tout ce qui sort de la cellule. Les substances nutritives et les molécules utiles entrent, les composés indésirables restent à l'extérieur et les déchets sont expulsés. Toutefois, dans la bataille sans merci que se livrent les espèces, les bactéries pathogènes ont appris à déjouer les systèmes de défense des cellules et à rompre l'équilibre assuré par les membranes cellulaires. Les bactéries pathogènes fabriquent des protéines qui trouent la membrane cellulaire : des substances étrangères pénètrent ainsi dans les cellules et le contenu cellulaire s'échappe. Le système immunitaire dispose lui aussi de protéines créatrices de pores qui détruisent les micro-organismes pathogènes.

Nous étudions les mécanismes d'action de ces protéines, et nous recherchons comment les modifier par génie génétique pour les utiliser en médecine. Nous essayons de fabriquer de telles sentinelles moléculaires qui, par exemple, permettraient de détruire les cellules cancéreuses, en augmentant leur sensibilité aux substances thérapeutiques. Nous pourrions aussi produire des membranes synthétiques

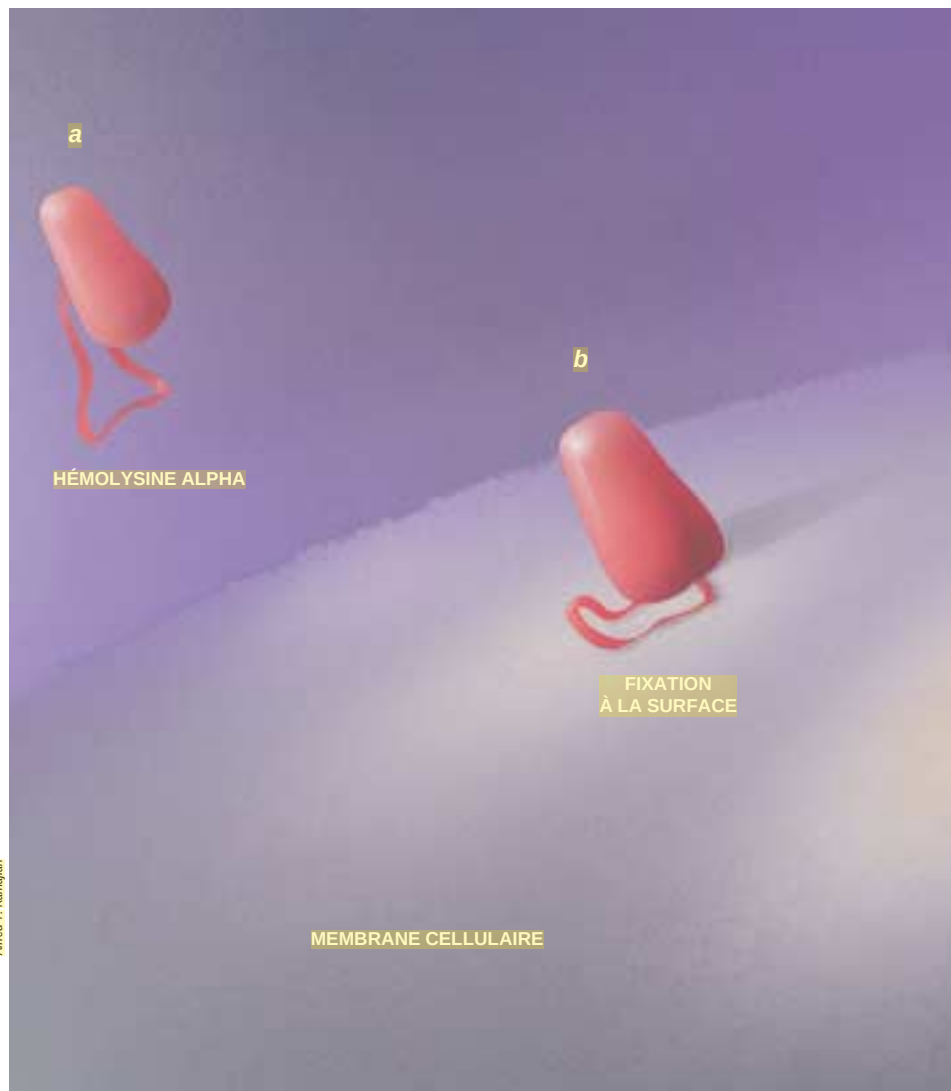
dont les pores artificiels serviraient de biocapteurs ou de distributeurs de médicaments.

Les protéines bactériennes formant des pores contiennent la protéine hémolysine alpha, qui est sécrétée par la bactérie *Staphylococcus aureus*, responsable d'infections à staphylocoques. La protéine attaque les cellules

cibles en perçant des pores d'environ deux nanomètres de diamètre, qui laissent passer de petites molécules, tel le saccharose, mais pas les molécules plus grandes (la plupart des protéines). En revanche, la streptolysine O, produite par la bactérie *Streptococcus*, perce des pores de plus de 30 nanomètres de diamètre. Comme l'hémolysine alpha,

1. L'ASSEMBLAGE de plusieurs molécules d'hémolysine alpha (a) forme un pore. Ces molécules se fixent d'abord à la surface de la membrane cellulaire (b). Lorsque sept de ces molécules sont assemblées (c), le fin brin central de chaque sous-unité perce la membrane pour former un canal (d). Les différentes sous-unités d'hémolysine alpha sont représentées par des couleurs différentes.

Alfred T. Kaniajan



la streptolysine détériore les cellules (voire les détruit) en perforant la membrane cellulaire.

Pourquoi nous intéressons-nous à l'hémolysine alpha ? D'abord parce qu'on sait la produire en grande quantité dans des cultures de bactéries ; c'est une protéine assez petite, constituée de 293 acides aminés, et elle est très stable (contrairement à d'autres protéines). En 1984, Gary Gray, de la Société *Biogen*, et Michael Kehoe, de l'Université de Genève, ont publié la séquence du gène codant cette protéine. En 1996, Eric Gouaux et ses collègues de l'Université de Columbia ont déterminé la structure tridimensionnelle du pore de l'hémolysine alpha : c'est un assemblage moléculaire en forme de champignon, constitué de sept molécules d'hémolysine alpha.

Selon Sucharit Bhakdi, de l'Université de Mayence, les molécules d'hémolysine alpha s'assembleraient en pores de deux façons. Certaines cellules, par exemple les hématies de lapin, portent des récepteurs de l'hémolysine alpha, qui commandent la forma-

tion des pores ou orientent l'hémolysine correctement à la surface de la membrane. Toutefois, même en l'absence de ces récepteurs, l'hémolysine alpha fonctionne : sur des membranes artificielles (constituées d'une double couche de lipides), les protéines s'assemblent spontanément en pores. C'est aussi le cas en présence de divers détergents. Cette propriété d'auto-assemblage spontané est particulièrement intéressante, quand on veut fabriquer des produits à base d'hémolysine alpha.

Les molécules d'hémolysine alpha, qui se lient à la membrane cellulaire ou à une membrane artificielle, s'assemblent par groupes de sept et forment un complexe. La région centrale de chaque monomère est un brin d'environ 40 acides aminés qui s'insère dans la membrane cellulaire et tapisse le canal ainsi ouvert.

Nous avons commencé nos recherches en utilisant les techniques de génie génétique pour modifier trois propriétés du pore d'hémolysine alpha : le diamètre du pore, la sélectivité du canal et sa capacité d'ouverture et de

fermeture. Dans les conditions normales, le pore d'hémolysine alpha est ouvert. Comment l'avons nous modifié par génie génétique ?

Sésame ouvre-toi !

Au début, nous ignorions comment le canal s'ouvre et se ferme. Nous avons réussi à placer des commutateurs dans la protéine, commandant ainsi l'ouverture et la fermeture du pore. Le génie génétique nous permettant de remplacer certains des acides aminés de la protéine par d'autres, nous avons inséré toute une variété de commutateurs potentiels dans l'hémolysine alpha et observé ceux qui fonctionnaient.

Les commutateurs moléculaires sont généralement de nature biochimique (ils sont activés par des enzymes) ou de nature chimique (ils sont activés par la fixation de petites molécules sur la protéine). Ils peuvent aussi être activés par un stimulus physique, par exemple la chaleur ou la lumière.

