

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.

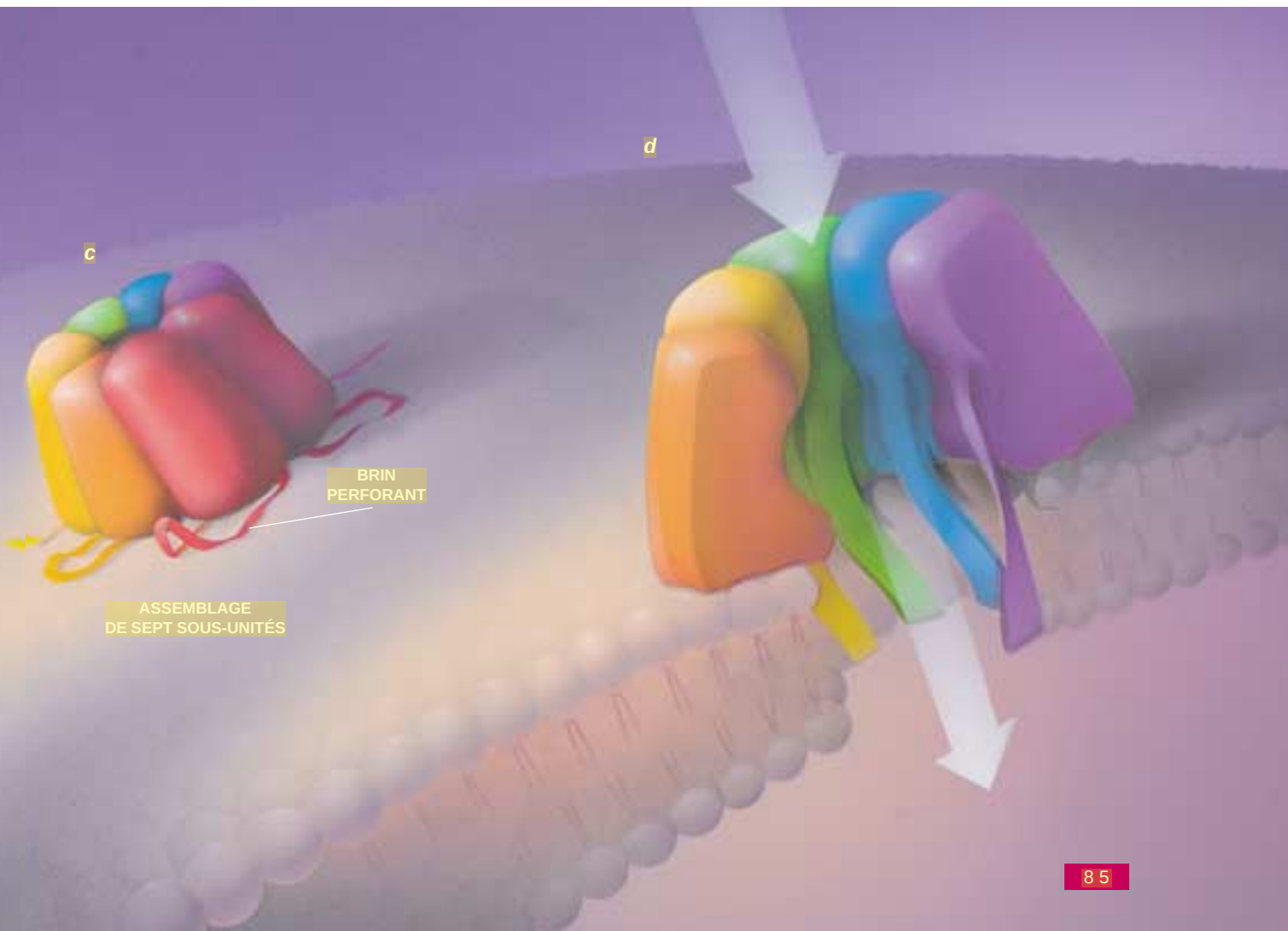
Nous avons commencé nos recherches en utilisant les techniques de génie génétique pour modifier trois propriétés du pore d'hémolysine alpha : le diamètre du pore, la sélectivité du canal et sa capacité d'ouverture et de

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.



Nous avons d'abord introduit un commutateur biochimique dans l'hémolysine alpha en ajoutant une petite chaîne polypeptidique (de 11 à 53 acides aminés) au brin central de la protéine qui, normalement, perce la membrane cellulaire. Un tel segment empêche la formation des pores; quand on élimine cet appendice à l'aide d'une enzyme nommée protéase, la molécule forme à nouveau des pores.

On pourrait choisir les commutateurs biochimiques de façon à ce que les hémolysines alpha ainsi formées ne percent des pores que dans des cellules cibles spécifiques. On pourrait diriger des hémolysines modifiées vers des cellules tumorales grâce à des fragments d'anticorps (spécifiques des cellules cancéreuses) insérés dans la protéine par génie génétique. Quand ces protéines hybrides atteindraient les cellules cancéreuses, les protéases libérées par les cellules cancéreuses activeraient la formation des pores (les cellules cancéreuses libèrent des protéases tumorales, des enzymes qui aident les cellules de la tumeur à s'échapper et à coloniser de nouveaux sites). Les hémolysines modifiées perceraient des trous dans les cellules cancéreuses, augmentant leur perméabilité et leur sensibilité aux médicaments cytotoxiques. Nous avons fabriqué des hémolysines alpha mutées activées par les protéases tumorales.

Nous tentons aussi d'introduire dans l'hémolysine alpha des commutateurs biochimiques qui, alternativement, ouvriraient et fermeraient les pores.

Des activateurs chimiques

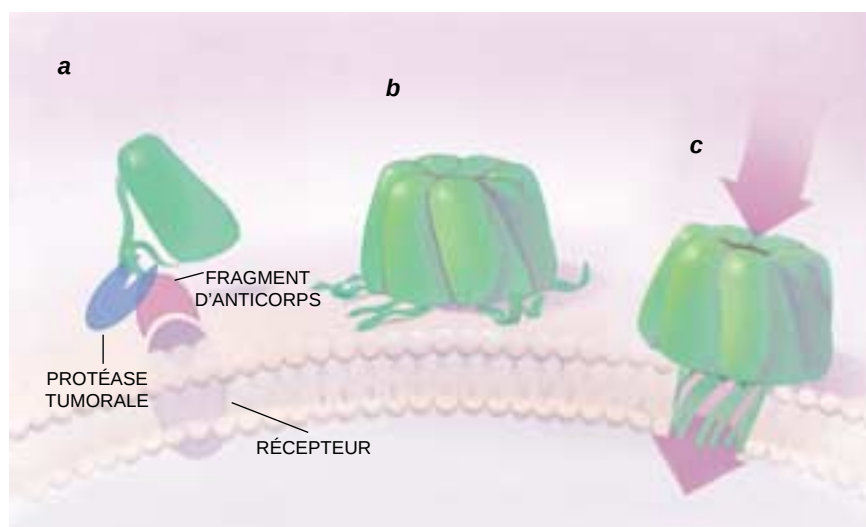
Nous avons ainsi inséré un commutateur dans l'hémolysine alpha, qui est activé par diverses petites molécules. Nous pensons produire par cette méthode des membranes artificielles, nommées biocapteurs, qui détecteraient les molécules toxiques, notamment les pesticides et les gaz neurotoxiques. Ainsi une hémolysine alpha mutée insérée dans la surface d'un liposome (une double couche de lipides formant une vésicule microscopique) forme un pore qui reste ouvert tant qu'un composé organique très réactif se lie à la région génétiquement modifiée de la molécule. On constate que le canal est ouvert, car le colorant fluorescent introduit dans le liposome au moment de son assemblage s'en échappe.

Nous avons également élaboré un commutateur chimique qui ouvre ou ferme les pores grâce à la fixation d'ions métalliques sur la protéine. Un tel commutateur serait utile pour le suivi de la pollution de l'eau, par exemple, à l'aide de biocapteurs. Le remplacement de cinq acides aminés dans le brin central de la protéine par cinq acides aminés histidine, crée un site de liaison pour le zinc et pour divers métaux, ce qui bloque la formation des pores. Une fois le pore ouvert, les ions peuvent l'obstruer en se liant au canal central,

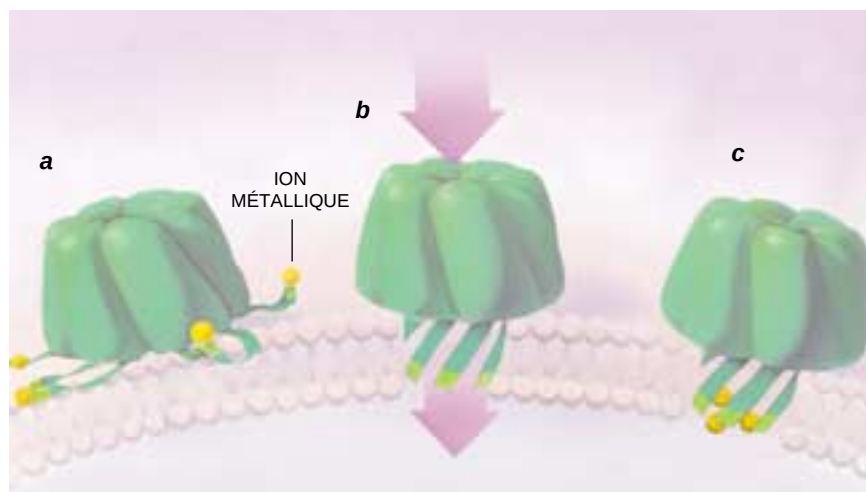
interdisant ainsi le passage des autres molécules.

Ces structures nommées H₅ (en raison des cinq molécules d'histidine), seraient des biocapteurs efficaces utilisables pour la recherche de polluants métalliques. On pourrait, par exemple, mesurer rapidement et en continu les concentrations en ions métalliques présents dans les eaux océaniques.

Grâce aux techniques du génie génétique appliquées à la structure H₅, nous avons produit des pores dont toutes les sous-unités ne sont pas iden-



2. LA PERFORATION DES CELLULES CANCÉREUSES facilite l'entrée des médicaments. Les biologistes ont mis au point une hémolysine alpha modifiée qui porte un fragment d'anticorps reconnu par certains récepteurs des cellules cancéreuses et qui empêche la formation des pores. Lorsque cette protéine modifiée atteint une cellule cancéreuse, les protéases tumorales (des protéines sécrétées par toutes les tumeurs) coupent le fragment d'anticorps (a). Lorsque les sept sous-unités de l'hémolysine alpha sont assemblées (b), le pore s'ouvre (c).



3. DES PORES DANS LES MEMBRANES CELLULAIRES peuvent s'ouvrir et se fermer sur commande. Lorsque des ions métalliques se fixent sur la protéine modifiée nommée H₅, ils empêchent la formation du canal (a). L'élimination des ions métalliques ouvre le pore (b); un nouvel apport d'ions métalliques referme le pore (c). On a utilisé cette technique pour introduire des composés cryoprotecteurs dans des cellules vivantes pour les conserver à basse température.