

Les signaux de localisation nucléaire : un sésame cellulaire pour le transport d'ADN ?

Les vecteurs viraux sont les plus répandus pour le transfert de gènes, puisque plus de 75 % des essais cliniques de thérapie génique utilisent ces systèmes. Malgré les avantages naturels de ces systèmes, on assiste actuellement au développement parallèle de vecteurs synthétiques, de type lipides ou polymères cationiques, permettant de complexer et de compacter l'ADN plasmidique [1]. Ces vecteurs sont potentiellement moins immunogènes et plus faciles à produire. Quel que soit le système choisi, le transfert de gènes nécessite que l'ADN exogène pénètre efficacement dans la cellule cible, et atteigne le noyau afin d'être transcrit et de conduire à l'expression de la protéine thérapeutique. Les virus, au cours de l'évolution, ont développé des mécanismes efficaces leur permettant de traverser les différentes barrières cellulaires et de délivrer leur matériel génétique dans le noyau des cellules cibles [2]. Les vecteurs synthétiques récents permettent de surmonter certains obstacles à la transfection, comme le passage de la membrane cytoplasmique et la sortie des endosomes [3, 4]. Mais, une fois l'ADN libéré dans le cytoplasme, celui-ci doit encore aller jusqu'au noyau. A l'heure actuelle, dans le cas des vecteurs non viraux, le passage de la membrane nucléaire constitue une des étapes limitantes du transfert de gènes [5]. En effet, l'enveloppe nucléaire est constituée d'une double couche lipidique qui ne peut être traversée qu'au niveau de structures supramoléculaires particulières appelées pores nucléaires (NPC) [6], ou bien lors de la rupture

de cette enveloppe au moment de la division cellulaire. Dans une cellule, le transport de macromolécules (taille > 40 kDa) à travers le pore nucléaire se fait par un mécanisme actif. Ce mécanisme fait intervenir une protéine « navette » (karyophérine/importine α) qui reconnaît une séquence peptidique particulière appelée NLS (*nuclear localization signal*) présente au sein des molécules à transporter [7]. Après association avec un troisième partenaire appelé importine β , le complexe ternaire est transporté dans le noyau à travers le pore nucléaire. Ce transport consomme de l'énergie et nécessite l'hydrolyse du GTP par Ran, une petite protéine G [8]. Le routage intracellulaire de l'ADN jusqu'au noyau est une étape mal connue et elle est probablement peu efficace dans le cas des vecteurs synthétiques [5, 9]. Une idée très séduisante pour améliorer cette étape consiste à utiliser les propriétés des peptides NLS afin d'emprunter les voies cellulaires physiologiques du transport nucléaire. La greffe d'un tel signal sur un vecteur synthétique n'ayant pas permis d'améliorer l'efficacité de la transfection [10], il est apparu indispensable d'insérer le signal NLS directement sur la molécule d'ADN. La construction de conjugués ADN-peptide NLS a été réalisée par ligature de deux oligonucléotides reliés en épingle à cheveux de part et d'autre d'un fragment

d'ADN linéaire contenant le gène de la luciférase de *Photinus pyralis* comme gène rapporteur (*figure 1*) [11]. Le peptide NLS de séquence PKKKRKVEDPYC*, correspondant au signal de localisation nucléaire de l'antigène T du virus SV40, a préalablement été couplé avec un de ces deux oligonucléotides. Un des avantages majeurs de cette construction réside dans le fait que le peptide est couplé à l'ADN en dehors de la séquence codante du gène rapporteur. Ainsi, la présence du peptide ne devrait pas interférer avec la transcription du transgène.

Les conjugués ADN-peptide NLS ont été transfectés dans plusieurs lignées cellulaires en utilisant comme vecteurs de transfection un polymère cationique, la PEI (polyéthylèneimine) [12], ou un lipide cationique, le DOGS (dioctadécylamidoglycylspermine) [13]. La quantification de l'activité de la luciférase montre que la présence du peptide NLS augmente l'efficacité de transfection obtenue avec ces deux vecteurs même pour de faibles quantités d'ADN. Dans une lignée de fibroblastes murins (NIH 3T3), les efficacités de transfection des conjugués ADN-peptide NLS sont 10 à 100 fois supérieures à celles obtenues en l'absence de peptide, et parfois 300 fois, comme dans le cas des cellules HeLa (cellules épithéliales de carcinomes humains). Cette amélioration de l'efficacité de transfection est abolie lorsque le peptide couplé à l'ADN comporte une mutation ponctuelle (PKTKRKVEDYC), mutation qui rend le peptide déficient pour le ciblage nucléaire [14]. Ce résultat

* Code à une lettre des acides aminés. A : Ala; C : Cys; D : Asp; E : Glu; F : Phe; G : Gly; H : His; I : Ile; K : Lys; L : Leu; M : Met; N : Asn; P : Pro; Q : Gln; R : Arg; S : Ser; T : Thr; V : Val; W : Trp; Y : Tyr.

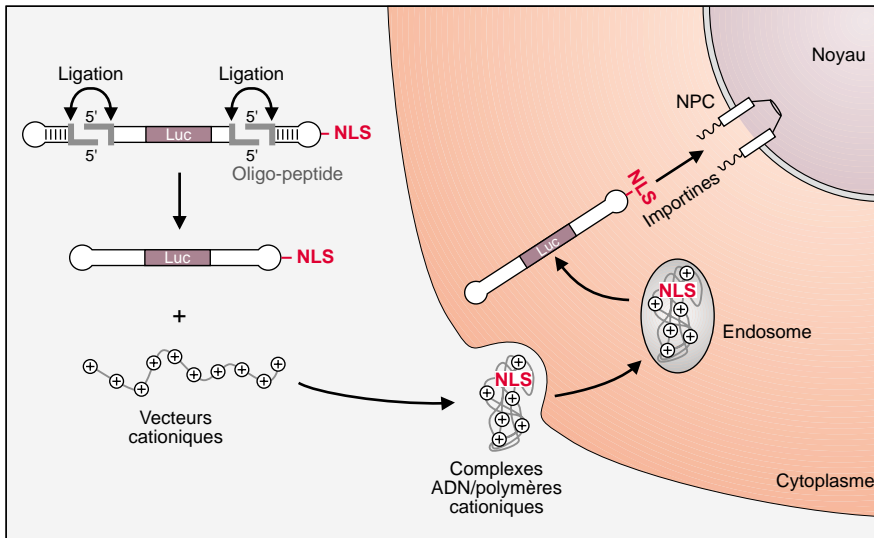


Figure 1. **Construction de conjugués ADN-peptide NLS.** Le couplage chimique du peptide se fait sur une base modifiée présente dans la boucle d'un des oligonucléotides repliés en épingle à cheveux. Une cystéine ajoutée à l'extrémité carboxy-terminale du peptide permet le couplage avec l'oligonucléotide. Sous leur forme repliée, les deux oligonucléotides présentent quatre bases non appariées du côté 5', conduisant à la formation d'une extrémité cohésive pouvant s'apparier dans un site de restriction. Le fragment d'ADN linéaire contenant le gène rapporteur est ligué avec le conjugué oligonucléotide-NLS à une des extrémités et avec l'oligonucléotide non modifié à l'autre extrémité. NLS: signal de localisation nucléaire; NPC: pore nucléaire; Luc: séquence codante pour la luciférase.

prouve que l'effet observé serait bien la conséquence de la prise en charge des conjugués ADN-peptide NLS par les mécanismes intracellulaires de transport vers le noyau.

Des méthodes différentes de construction de conjugués ADN-peptide NLS ont été décrites [15, 16] mais, malgré une amélioration du transport nucléaire, elles n'entraînent pas d'augmentation significative des efficacités de transfection. Ce résultat pourrait s'expliquer, en partie, par la présence, au sein de la séquence codante du gène rapporteur, d'un grand nombre de peptides NLS couplés à l'ADN.

La démonstration présentée ici de l'utilité des signaux peptidiques de

localisation nucléaire pour le transport de l'ADN exogène vers le noyau ouvre des perspectives intéressantes pour le transfert de gènes relayé par les vecteurs synthétiques. D'autres stratégies de couplage sont actuellement en cours de développement qui pourraient permettre la production de quantités de conjugués ADN-peptide-NLS suffisantes pour des applications *in vivo*. Les futurs tests réalisés sur des modèles animaux permettront de savoir si les peptides NLS représentent réellement pour l'ADN le « sésame » d'entrée dans le noyau.

P.B.V.
J.P.B.

1. Legendre J, Haensler J, Rémy J. Les vecteurs non viraux de thérapie génique. *Med Sci* 1996; 12: 1334-41.
2. Greber UF. In: Kabanov AV, Felgner PL, Seymour LW, eds. *Self-assembling complexes for gene delivery: from laboratory to clinical trial*. Chichester: Wiley, 1998: 89-114.
3. Behr J. L'éponge à protons: un moyen d'entrer dans une cellule auquel les virus n'ont pas pensé. *Med Sci* 1996; 12: 56-9.
4. Mislick KA, Baldeschwieler JD. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12349-54.
5. Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995; 270: 18997-9007.
6. Panté N, Aebi U. Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1996; 31: 153-99.
7. Ohno M, Fornerod M, Mattaj JW. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* 1998; 92: 327-36.
8. Dorseuil O. Petite protéine G Ran et contrôle de l'import-export nucléaire. *Med Sci* 1998; 14: 85-9.
9. Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP, Escande D. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 7507-11.
10. 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 toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1744-8.
11. Zanta MA, Belguise-Valladier P, Behr JP. Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 91-6.
12. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. 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.
13. Behr JP, Demeneix B, Loeffler J, Perez-Mutul J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6982-6.
14. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 1984; 39: 499-509.
15. Sebestyén MG, Ludtke JJ, Bassik MC, et al. DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat Biotech* 1998; 16: 80-5.
16. Ciolina C, Byk G, Blanche F, Thuillier V, Scherman D, Wils P. Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha. *Bioconj Chem* 1999; 10: 49-55.