

# Liposomes chargés en ARNsi : Inhibition de l'enkystement d'Acanthamoeba et toxicité sur l'œil

La kératite amibienne est une pathologie rare mais dévastatrice. En raison de la forme kystique résistante aux traitements, l'infection peut être persistante. À partir de cette constatation, des chercheurs ont étudié l'action sur l'œil d'une séquence d'ARNsi intégrée à un liposome qui permettrait de réduire l'enkystement d'Acanthamoeba et donc de diminuer le temps de traitement et d'améliorer son pronostic.

## Introduction

**Les kératites à Acanthamoeba sont causées par un protozoaire opportuniste. Il est ubiquitaire et vit librement dans un grand nombre d'environnements (eau douce, eau du robinet, conduit de ventilation, piscine...).**

Son cycle se déroule sous deux formes : la forme kystique avec une double paroi qui lui permet de résister dans des conditions très défavorables<sup>1</sup> et la forme trophozoïte que l'on retrouve dans des conditions plus favorables, lui permettant de se reproduire<sup>2</sup> et se nourrir de petites bactéries, d'autres protozoaires, ou, une fois dans la cornée, de kératocytes<sup>3</sup>. Les premiers cas rapportant cette amibe comme agent de maladie datent des années 1970<sup>4</sup>.

Les facteurs de risque sont majoritairement reliés au non-respect des conditions recommandées de port et d'hygiène des lentilles de contact (85,6%)<sup>5</sup> qui peuvent entraîner la formation d'un biofilm sur les lentilles, rendre les solutions de nettoyage non stériles, occasionner des traumatismes cornéens, ou encore au fait de nager avec des lentilles de contact<sup>6</sup>. Le nombre de cas de kératite amibienne augmente, car les porteurs de lentilles de contact sont de plus en plus nombreux. Cependant, des non-porteurs de lentilles peuvent aussi être à risque<sup>2</sup>.

Cette kératite se manifeste par une douleur très intense, une hyperhémie conjonctivale, de l'épiphorèse, une sensation de corps étranger ou encore de la photophobie. Elle est généralement unilatérale; les signes les plus communs sont la kératite ponctuée superficielle, des pseudodendrites et des infiltrats épithéliaux. Quand la maladie progresse, on peut remarquer un infiltrat en forme d'anneau spécifique, un ulcère ou encore une uvéite avec hypopion<sup>3</sup>. On les retrouve généralement en périphérie moyenne de la cornée<sup>7</sup>.

**Le début de la maladie  
peut facilement être confondu  
avec une kératite à herpès simplex.  
À un stade plus avancé, la maladie  
ressemble davantage à une kératite  
ou à un ulcère cornéen fongique<sup>3</sup>.**

La microscopie confocale a montré une certaine efficacité pour le diagnostic différentiel avec la kératite fongique<sup>8</sup>. Mais la culture est très utilisée. Cependant, son temps d'incubation est très long, jusqu'à 21 jours. L'amplification en chaîne par polymérase est beaucoup plus rapide, mais elle est plus coûteuse.<sup>9</sup>

Les lentilles de contact peuvent stimuler l'expression des glycoprotéines sur l'épithélium cornéen, et cela peut aggraver le processus infectieux, car les protéines mannosylées favorisent la liaison des trophozoïtes à l'épithélium cornéen. Une fois l'apoptose des cellules épithéliales effectuée, *Acanthamoeba* peut alors pénétrer la membrane basale et dégrader le collagène du stroma<sup>10</sup>.

Le traitement de cette kératite est assez hasardeux et non spécifique. La forme trophozoïte du parasite est réactive à de nombreux traitements, car elle est relativement fragile. Malheureusement, les kystes sont beaucoup plus difficiles à traiter; on utilise généralement des biguanides ou des diamines. Plus le stade est précoce, plus le traitement sera court et meilleure sera l'acuité visuelle finale. A l'inverse, si l'amibe s'est enkystée, ce qui provoque l'infiltration de cellules inflammatoires et le stade avancé, plus le traitement sera long et difficile pour l'œil. De plus, les kystes entraînent souvent une récurrence après l'arrêt du traitement, ce qui rend ce dernier long et fastidieux<sup>3</sup>.

## Développement d'une nouvelle approche dans la prise en charge de la kératite à *Acanthamoeba*

Dernièrement, Faber et ses collaborateurs<sup>11</sup> ont entrepris de s'attaquer à la transformation du trophozoïte en kyste, en développant un liposome chargé en petit ARN interférent (ARNsi : «small interfering RNA») spécifique afin de faciliter le traitement de la kératite à *Acanthamoeba*.

La séquence d'ARNsi, développée précédemment<sup>12</sup>, inhibe la synthèse de la phosphorylase du glycogène. Cette enzyme est responsable de la biosynthèse de protéines clés dans la formation du kyste d'*Acanthamoeba*. Les ARNsi sont des molécules instables qui doivent être protégées de l'hydrolyse et de la dégradation enzymatique. Ils remplissent de nombreuses fonctions, dont l'inhibition post-transcriptionnelle des gènes, c'est-à-dire qu'ils détruisent l'ARNm cible. Il n'y a pas de traduction en protéine. Le problème de cette séquence est sa cytotoxicité en raison notamment de l'absence d'un transporteur adéquat<sup>13</sup>.

**Parmi tous les transporteurs disponibles, le liposome semble un des plus prometteurs car il peut s'affranchir de limites oculaires. En effet, il augmente le temps de rétention oculaire et l'absorption des médicaments. Il offre aussi une excellente bio-tolérance<sup>14</sup>.**

La structure formée par des lipides chargés positivement va former un complexe stable avec les ARNsi qui, eux, sont chargés négativement grâce aux groupements phosphates. Le tout facilite le contact avec la membrane cellulaire et permet au complexe d'entrer ou non, en fonction de sa taille, dans la cellule par endocytose<sup>15</sup>.

Des tailles de liposomes supérieures à 200 nm, comme celles observées pour le liposome chargé en ARNsi (environ 250 nm), pourraient être bénéfiques pour l'administration oculaire visant les trophozoïtes. L'endocytose dans les cellules humaines se produit généralement pour des particules ayant des tailles inférieures à 200 nm. L'internalisation par l'épithélium cornéen n'est pas visée ici, car la concentration active pourrait alors être diminuée<sup>16</sup>.

Le maintien d'un potentiel zêta loin de la neutralité est important pour la stabilité colloïdale. Selon la théorie DLVO (du nom de ses auteurs), il y a deux facteurs principaux responsables de la stabilité colloïdale : sa charge globale et son encombrement stérique.

Dans le cas des liposomes, la présence des chaînes de PEG (PolyEthylène Glycol) et de DOTAP (réactif de transfert de gène liposomal) conduit à un encombrement stérique et à une répulsion plus élevée (potentiel zêta + 65 mV), contribuant ainsi à maintenir la stabilité colloïdale.

**De plus, on sait que les nanostructures chargées positivement se lient à la surface oculaire avec une plus grande affinité que les nanostructures chargées négativement ou neutres<sup>17</sup>. La charge positive permet des interactions entre la membrane cellulaire des trophozoïtes et les liposomes, ce qui peut augmenter significativement l'efficacité du transfert du gène.**

Faber et ses collaborateurs ont donc décrit l'incorporation de cette séquence d'ARNsi dans des liposomes cationiques PEGysés. Les liposomes ont été préparés en utilisant du DOTAP (réactif de transfert de gène liposomal), du DOPE (qui contribue à l'efficacité de l'expression du gène) et du DSPE-PEG (polymère de phospholipides) avec des proportions fixes (2 : 1 : 0,02) et ont été assemblés selon trois techniques différentes : nanoprécipitation par déplacement du solvant, hydratation du film par homogénéisation par haute pression et hydratation du film par extrusion membranaire. Par la suite, les auteurs ont intégré aux liposomes de l'ARNsi actif à trois concentrations 0,5 µM, 1 µM et 1,5 µM ou de l'ARNsi contre la protéine fluorescente verte en tant qu'ARNsi témoin négatif. Leur association (lipoplex) a été vérifiée par différentes méthodes telles que la fluorescence, l'absorbance UV-visible et par électrophorèse.

Après 24 heures d'incubation dans les milieux de cultures pertinents de cellules épithéliales cornéennes humaines ou d'*Acanthamoeba* spp, les auteurs ont montré que la taille des liposomes vides ne diffère pas, ce qui suggère leur bonne stabilité générale. Les lipoplex n'ont également pas montré de dégradation durant cette même période. Ils ont présenté une taille et une distribution optimales.

L'évaluation de la toxicité des excipients (DOTAP, DSPE-PEG et DOPE) isolés a été réalisée sur des cellules de l'épithélium cornéen humain, et leur activité sur des lactates déshydrogénases (considérés comme un marqueur de dommage tissulaire) a été mesurée. Seul le DOTAP avait une légère différence statistiquement significative avec les concentrations étudiées. Certaines considérations doivent cependant être prises en compte. Premièrement, ils ne formaient pas une solution réaliste en étant dans l'eau; deuxièmement, en raison de la bicouche des liposomes, environ la moitié des molécules se trouvaient à l'intérieur de la vésicule et n'interagissaient pas vraiment avec les cellules. Par conséquent, l'effet réel sur les cellules de l'épithélium cornéen peut être sous-estimé.


Les liposomes chargés ont par la suite été étudiés. Les différentes formulations ont été relativement bien tolérées après une période de 3 heures. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les dosages. Après 24 heures, il ressort une grande variation de la viabilité des cellules si on compare les liposomes vides et ceux chargés avec l'ARNsi actif. Seule la plus faible concentration n'a pas montré de différence de tolérance avec les liposomes vides. Néanmoins, une incubation de 3 heures imite des conditions plus réalistes en raison du faible temps de rétention de la formulation dans l'œil, causé par le drainage, l'effet de dilution des larmes et le clignement difficiles à reproduire in vitro.

*In vivo*, des observations macroscopiques ont été réalisées sur des souris après 8 instillations de lipoplex pendant 24 heures. Il n'y a eu aucun signe d'inflammation, d'altération ou d'infiltration cellulaire. Cette méthode chez l'animal est plus représentative et donne un aperçu plus réaliste du potentiel toxique des liposomes.

**Enfin, les auteurs ont démontré que les 3 concentrations de lipoplex actifs conduisaient à une réduction de la capacité d'enkystement après 3 jours, qui était très différente du témoin. Nous avons donc bien une efficacité de ce lipoplex.**

La capacité d'enkystement a été réduite de moitié pour les concentrations testées, ce qui suggère qu'il n'y a pas de dépendance de la dose. Cela sous-entendrait l'utilisation de la plus faible concentration. Cependant, il y avait une légère réduction de l'enkystement par la séquence témoin de l'ARNsi, soulignant la nécessité d'un tel contrôle. Toutefois, l'action due à l'appariement d'une séquence non spécifique est connue dans la littérature 18.

## Conclusion

Les liposomes chargés en ARNsi spécifiques possèdent un potentiel d'amélioration du pronostic dans le traitement de la kératite à *Acanthamoeba*. Cependant, le système de délivrance doit encore être développé afin de trouver l'équilibre délicat entre une formulation active et son absence de toxicité sur l'œil. 

1. Aksozek A, McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J Parasitol*. 2002 Jun;88(3):621-3. PubMed PMID: 12099437.
2. Lakhundi S, Siddiqui R, Khan NA. Pathogenesis of microbial keratitis. *MicrobPathog*. 2017 Mar;104:97-109. doi: 10.1016/j.micpath.2016.12.013. Epub 2016 Dec 18. Review. PubMed PMID: 27998732.
3. Maycock NJ, Jayaswal R. Update on *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Cornea*. 2016 May;35(5):713-20. doi: 10.1097/ICO.0000000000000804. Review. PubMed PMID: 26989955.
4. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *ClinMicrobiol Rev*. 2003 Apr;16(2):273-307. Review. PubMed PMID: 12692099; PubMed Central PMCID: PMC153146.
5. Lee MH, Abell RG, Mitra B, Ferdinands M, Vajpayee RB. Risk factors, demographics and clinical profile of *Acanthamoeba* keratitis in Melbourne: an 18 year retrospective study. *Br J Ophthalmol*. 2017 Aug 27. pii:bjophthalmol-2017-310428. doi: 10.1136/bjophthalmol-2017-310428. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28844988.
6. Brown AC, Ross J, Jones DB, Collier SA, Ayers TL, Hoekstra RM, Backensen B, Roy SL, Beach MJ, Yoder JS; *Acanthamoeba* Keratitis Investigation Team. Risk Factors for *Acanthamoeba* Keratitis-A Multistate Case-Control Study, 2008-2011. *Eye Contact Lens*. 2017 Jan 17. doi: 10.1097/ICL.0000000000000365. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28099282.
7. Diec J, Carnt N, Tilia D, Evans V, Rao V, Ozkan J, and Holden BA. Prompt Diagnosis and Treatment of Microbial Keratitis in a Daily Wear Lens. *Optometry and Vision Science*. 2009; 86; 7: E904-E907.
8. Vaddavalli PK, Garg P, Sharma S, Sangwan VS, Rao GN, Thomas R. Role of confocal microscopy in the diagnosis of fungal and *acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*. 2011 Jan;118(1):29-35. doi: 10.1016/j.ophtha.2010.05.018. PubMed PMID: 20801515.
9. Maubon D, Dubosson M, Chiquet C, Yera H, Brenier-Pinchart MP, Cornet M, Savy O, Renard E, et Pelloux H. A One-Step Multiplex PCR for *Acanthamoeba* Keratitis Diagnosis and Quality Samples Control. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2012; 53; 6: 2866-2872.
10. Alizadeh H, Neelam S, Hurt M and Niederkorn JY. Role of Contact Lens Wear, Bacterial Flora, and Mannose-Induced Pathogenic Protease in the Pathogenesis of Amoebic Keratitis. *Infection and Immunity*. 2005; 73; 2: 1061-1068.
11. Faber K, Zorzi GK, Brazil NT, Rott MB, Teixeira HF. siRNA-loaded liposomes: Inhibition of encystment of *Acanthamoeba* and toxicity on the eye surface. *ChemBiol Drug Des*. 2017 Sep;90(3):406-416. doi: 10.1111/cbdd.12958. Epub 2017 Apr 4. PubMed PMID: 28135787.
12. Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Santana-Morales MA, Afonso-Lehmann RN, Maciver SK, Valladares B, Martínez-Carretero E. Therapeutic potential of a combination of two gene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Dec;54(12):5151-5. doi: 10.1128/AAC.00329-10. Epub 2010 Sep 20. PubMed PMID:20855732; PubMed Central PMCID: PMC2981231.
13. Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Abreu-Acosta N, Ballart D, Martínez E, Valladares B. RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine proteases genes in *Acanthamoeba*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *MolBiochemParasitol*. 2005 Nov;144(1):10-5. PubMed PMID: 16105699.
14. Iqbal MA, Md S, Sahni JK, Baboota S, Dang S, Ali J. Nanostructured lipid carriers system: recent advances in drug delivery. *J Drug Target*. 2012 Dec;20(10):813-30. doi: 10.3109/1061186X.2012.716845. Epub 2012 Aug 29. Review. PubMed PMID: 22931500.
15. Wang Y, Rajala A, Rajala RV. Lipid Nanoparticles for Ocular Gene Delivery. *J Funct Biomater*. 2015 Jun 8;6(2):379-94. doi: 10.3390/jfb6020379. Review. PubMed PMID: 26062170; PubMed Central PMCID: PMC4493518.
16. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*. 2004 Jan 1;377(Pt 1): 159-69. PubMed PMID: 14505488; PubMed Central PMCID: PMC1223843.
17. Rabinovich-Guilatt L, Couvreur P, Lambert G, Dubernet C. Cationic vectors inocular drug delivery. *J Drug Target*. 2004;12(9-10):623-33. Review. PubMed PMID:15621688.
18. Parraga JE, Zorzi GK, Diebold Y, Seijo B, Sanchez A. Nanoparticles based on naturally-occurring biopolymers as versatile delivery platforms for delicate bioactive molecules: an application for ocular gene silencing. *Int J Pharm*. 2014 Dec 30;477(1-2):12-20. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.049. Epub 2014 Sep 30. PubMed PMID: 25275936.