

de ses liaisons), sa réactivité, ou encore le coût de sa synthèse ou la disponibilité commerciale des réactifs. Une analyse statistique préalable des variables permet de sélectionner les plus pertinentes. Par exemple, quand on explore une chimiothèque de peptides, molécules très flexibles, on utilise de préférence tous les descripteurs qui ne dépendent pas de la géométrie de la molécule, mais seulement de sa topologie, laquelle reste identique quelle que soit la géométrie.

L'ensemble des clés permet de définir la diversité des molécules d'une chimiothèque, de comparer deux chimiothèques, et de caractériser les «trous» de diversité, c'est-à-dire les plages de variations non décrites par certaines variables. On calcule aisément les distances séparant les molécules dans l'espace de leurs descripteurs : plus la distance qui sépare des molécules est grande, plus ces molécules sont diverses par rapport aux descripteurs utilisés.

Lors de la conception d'une chimiothèque virtuelle, on en limite la taille en évaluant la diversité apportée par chaque nouvelle molécule : soit l'enrichissement en diversité est suffisant, et la molécule est ajoutée à la banque combinatoire, soit il ne l'est pas, et la molécule est rejetée (il sera inutile de la synthétiser, puisque *a priori* elle n'apporte aucune information supplémentaire par rapport aux molécules déjà présentes dans la banque).

Une fois la chimiothèque virtuelle créée, une analyse statistique peut réduire encore la taille de la banque avec une perte limitée d'informations.

De nouveaux immunosuppresseurs

Nous avons appliqué notre méthode à la recherche d'immunosuppresseurs menée par une entreprise de biotechnologie américaine. Les immunosuppresseurs limitent, voire suppriment, les réactions du système immunitaire responsables notamment des rejets de greffe. On disposait d'une molécule qui semblait rendre des souris plus tolérantes aux greffes de cœur. Comment améliorer l'activité et la stabilité de cette molécule ?

La première molécule active était un peptide, c'est-à-dire un enchaînement d'acides aminés ; nous avons comparé sa séquence avec celle d'autres

peptides très proches dont l'activité avait été mesurée expérimentalement. Nous avons trouvé que l'on pouvait faire varier six acides aminés et que certains descripteurs permettaient de séparer les molécules actives des inactives.

Nous disposions pour cette étude de 35 types d'acides aminés différents (les 20 acides aminés naturels et 15 autres artificiels), la banque combinatoire potentielle contenait près de deux milliards de molécules, trop, même pour l'ensemble des ordinateurs de la planète ! Heureusement, les six positions variables étaient soumises à diverses contraintes physico-chimiques, et certaines combinaisons n'apportaient aucune diversité à la banque. De plus, nous savions que la synthèse de certaines combinaisons d'acides aminés ne serait pas réalisable, et nous les avons éliminées de la chimiothèque virtuelle.

Il ne restait alors plus «que» 279 936 molécules virtuelles à tester. Après avoir encore affiné les critères de sélection, il ne restait que cinq molécules présentant les caractéristiques nécessaires pour être biologiquement actives *in vivo*. Seules ces cinq molécules ont été réellement synthétisées, puis testées sur des souris greffées. Parmi ces cinq molécules, quatre ont été plus actives que la molécule testée initialement. L'une d'elles est environ 1 000 fois plus active : traitées par cet immunosuppresseur, les souris meurent de vieillesse sans avoir rejeté leur cœur étranger transplanté.

La chimie combinatoire est un outil puissant d'accès à la biodiversité. Grâce à cette stratégie, nous synthétisons seulement les molécules sélectionnées par l'ordinateur. La chimie combinatoire virtuelle optimise la sélection des molécules qui ont l'activité biologique potentielle la meilleure.

Roger LAHANA est Directeur des développements en modélisation moléculaire de la Société Synt:em.

R. LAHANA, *Les outils de la modélisation moléculaire*, in *Biofutur*, Technoscope, n° 144, pp.1-8, 1995.

R. LAHANA, *Similitude moléculaire et activité biologique*, in *Pour La Science*, pp. 54-60, juin 1995.

A. YASRI et al., *Rational Choice of Molecular Dynamics Simulation Parameters through the Use of Conformational Autocorrelation 3-D Method*, in *Protein Engineering*, vol. 9, n° 11, pp. 959-976, 1996.

La thérapie génique, promesses et limites

THEODORE FRIEDMANN

Les biologistes modifient des virus et fabriquent des agrégats moléculaires pour introduire des gènes dans les cellules de personnes malades.

A la fin du XIX^e siècle, les associés de l'architecte Daniel Burnham le regardaient avec scepticisme dessiner les plans de quelques-uns des premiers gratte-ciel modernes. Inversement, Burnham leur enjoignait d'avoir «des plans d'envergure, pleins d'une magie capable d'émouvoir l'imagination humaine». Il les incitait à dépasser les limites traditionnelles de l'architecture, à imaginer des projets entièrement nouveaux, à réaliser des exploits impensables auparavant.

Depuis quelques siècles, la médecine est aussi bouleversée sans cesse : elle s'est enrichie de l'utilisation du microscope, de l'anesthésie, de la vaccination, des antibiotiques, des transplantations... Elle s'apprête à passer un autre cap : bientôt, nous soignerons de nombreuses maladies, héréditaires ou non, en insérant des gènes dans les cellules des malades.

Quelques chercheurs trop enthousiastes, des industriels et des journalistes ont laissé croire que les applications cliniques de la thérapie génique étaient au point : c'est exagéré. Les fondements théoriques de la thérapie génique sont connus, et chaque fois qu'un nouveau gène est découvert, les biologistes cherchent s'il peut être utilisé pour soigner une maladie. En revanche, bien que l'on sache faire fonctionner des gènes transférés dans l'organisme humain et que l'on améliore ainsi la santé des patients, on n'a pas encore prouvé l'efficacité à long terme d'un traitement par thérapie génique.

Le manque de résultats cliniques spectaculaires est dû en grande partie aux tâtonnements initiaux, comme il y en a chaque fois que l'on met au

point une nouvelle technique, et aussi à des obstacles plus importants que ceux que nous avons prévus. L'absence d'efficacité des premiers traitements incite à la modestie, mais elle ne remet pas en question les promesses de la thérapie génique : les essais cliniques sur des malades ont commencé il y a à peine dix ans.

Comment insérer des gènes étrangers dans des cellules et les rendre fonctionnels ? Les biologistes utilisent le plus souvent des virus, parce que ceux-ci, naturellement, infectent les cellules en y insérant leurs propres gènes. En les modifiant, on veut éviter leurs effets pathogènes et leur donner une action thérapeutique adaptée aux différentes pathologies.

Nous n'examinerons ici que les thérapies relatives aux cellules somatiques, c'est-à-dire ne concernant ni les spermatozoïdes ni les ovocytes : jusqu'à présent, les chercheurs en thérapie génique se sont interdit de modifier la descendance des personnes traitées. Toutefois, depuis le clonage récent d'une brebis adulte, un débat public clarificateur sur les bienfaits et les risques d'une thérapie des cellules germinales devient urgent.

ADN, ARN et protéines

Avant d'examiner les obstacles à la mise en œuvre de la thérapie génique, examinons comment les gènes participent à la synthèse des protéines. Une protéine est une molécule formée d'un enchaînement d'acides aminés. Les gènes, qui codent les protéines, sont également des molécules formées par l'enchaînement de petites molécules

nommées bases : un groupe de trois bases successives code un acide aminé. Le passage de l'ADN à la protéine s'effectue indirectement : d'abord l'ADN est recopié sous la forme d'ARN messager, puis les organites intracellulaires nommés ribosomes synthétisent la protéine à partir de l'ARN, en traduisant les groupes de trois bases en acides aminés qui s'enchaînent successivement. Les gènes, pour y revenir, sont rassemblés en chromosomes, dans le noyau des cellules. Toutes les cellules d'un même organisme contiennent les mêmes gènes, mais toutes ne les utilisent pas tous. Ainsi, les cellules du foie se comportent différemment des neurones, parce qu'elles fabriquent des ensembles de protéines différents, en utilisant («exprimant») différents sous-ensembles de gènes : dans chaque cellule, seuls certains gènes sont transcrits en ARN messager.

Quand une mutation touche un gène particulier, la protéine correspondante peut ne pas être fabriquée, fonctionner au ralenti ou, au contraire, être trop active. Ce défaut de fabrication peut perturber les fonctions vitales des cellules et des tissus qui utilisent la protéine produite par le gène anormal, et déclencher les symptômes d'une maladie.

Classiquement, les médecins traitent les maladies dues à des mutations génétiques héréditaires en intervenant sur les conséquences biologiques de ces mutations. Par exemple, contre la phénylcétonurie (une accumulation toxique de produits du métabolisme de l'acide aminé phénylalanine, due à l'absence d'un gène), on a longtemps prescrit un régime alimentaire qui réduit l'absorption de la phénylala-

nine. Toutefois, ces interventions non génétiques sont peu efficaces.

Comment remédier à la cause initiale de telles maladies? L'inefficacité des autres thérapeutiques, une meilleure compréhension du fonctionnement des gènes et la découverte des gènes responsables d'un grand nombre de maladies héréditaires ont mis les médecins sur la voie de remèdes définitifs, au début des années 1970. Puis on a découvert que même des maladies acquises avaient une composante génétique, qu'il est théoriquement possible de corriger. Ainsi des traitements sont expérimentés contre des maladies héréditaires, telles la mucoviscidose (maladie des poumons), la myopathie, la déficience en adénosine désaminase (qui altère gravement le système immunitaire), l'hypercholestérolémie familiale (qui conduit à l'apparition précoce d'une artériosclérose grave) et, surtout, contre des cancers. Dans la plupart des cas, ces derniers ne sont pas héréditaires, mais résultent d'une accumulation d'altéra-

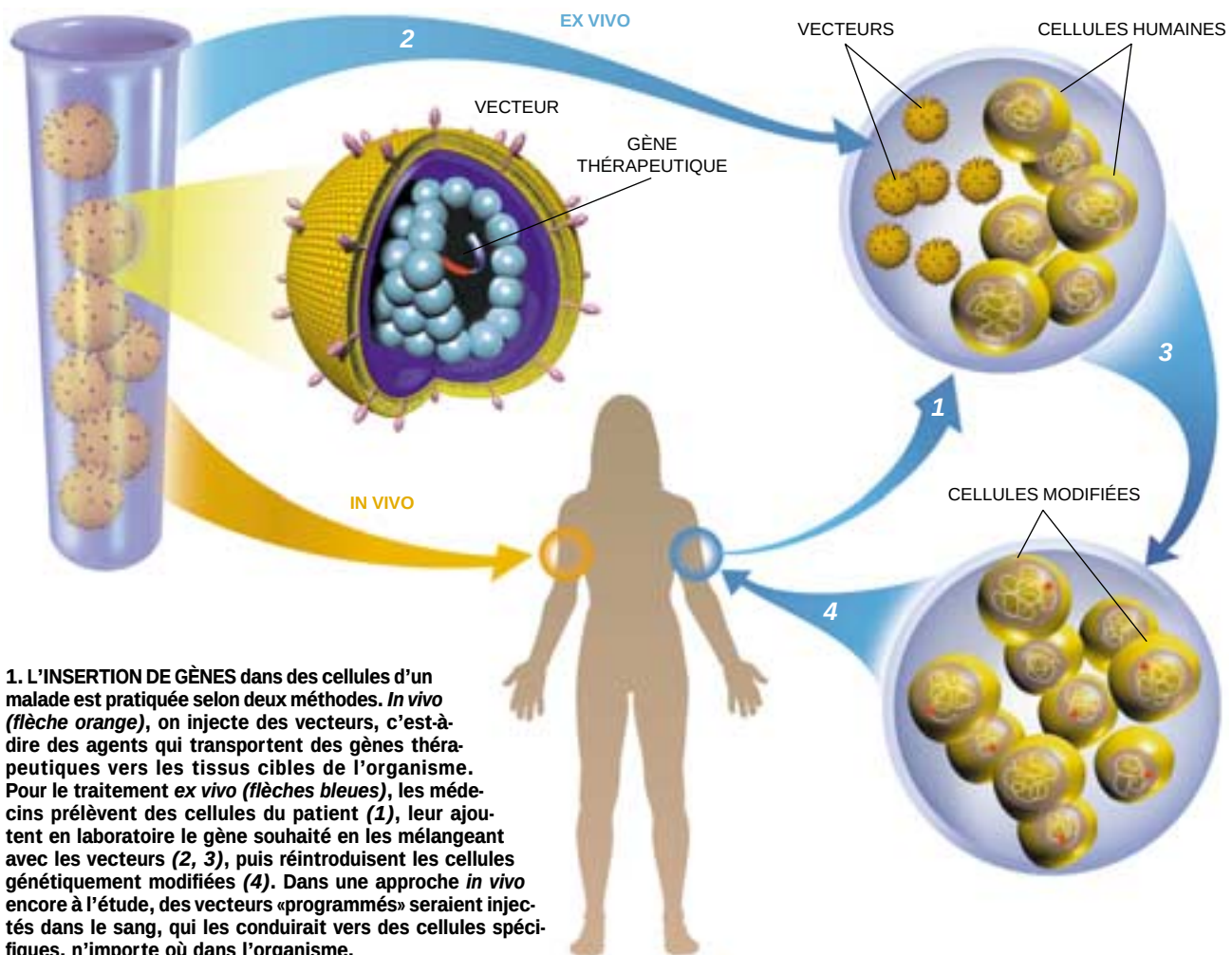
tions génétiques se produisant après la naissance. Un certain nombre d'essais concernent aussi le SIDA, causé par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

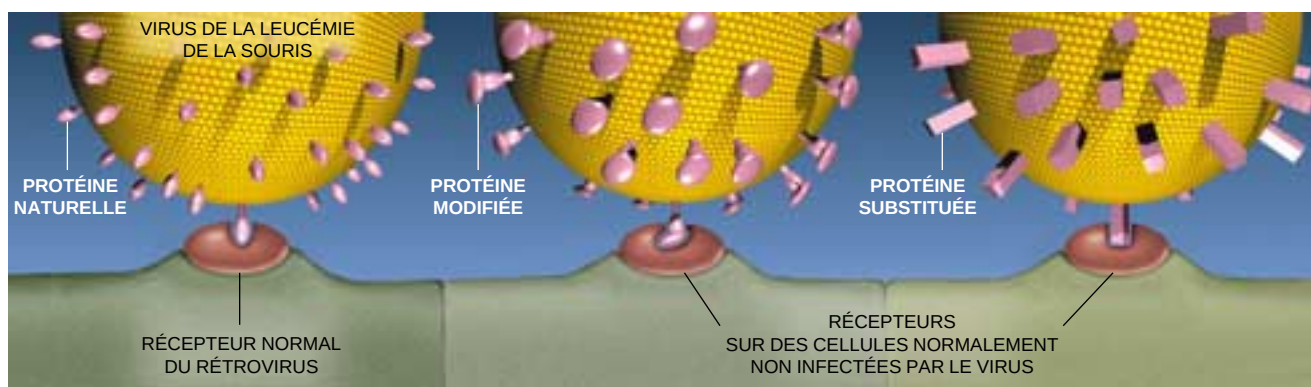
En principe, on peut remplacer physiquement un gène défectueux d'un chromosome par un gène normal. En pratique, une insertion aussi précise n'est pas encore réalisable chez l'homme... mais elle n'est pas non plus indispensable : dans la plupart des traitements par thérapie génique, on ajoute seulement un gène utile dans un certain type de cellules, afin de pallier l'inefficacité du gène présent ou d'introduire une propriété nouvelle. Bien des thérapies géniques anticancéreuses étudiées aujourd'hui suivent ce principe : elles visent à faire fabriquer, par les cellules cancéreuses, des substances qui les tueront directement, déclencheront une réaction immunitaire ou bloqueront l'irrigation sanguine des tumeurs, les empêchant ainsi de croître.

D'autre part, quelques équipes tentent d'empêcher la synthèse ou l'action de protéines nuisibles, produites par un gène défectueux. Une première approche est celle des ADN antisens : à l'aide de courtes séquences d'ADN synthétique, on empêche les segments d'ARN messager de gènes mutants de synthétiser des protéines. Des procédés voisins utilisent de petites molécules d'ARN, nommées ribozymes, pour dégrader l'ARN messager provenant de gènes anormaux. Enfin, on tente d'utiliser des hybrides d'ADN et d'ARN afin de réparer des gènes mutants. Une autre méthode consiste à insérer le gène d'une protéine nommée anticorps intracellulaire, qui bloque l'activité de la protéine mutante.

Des cellules modifiées

On utilise aujourd'hui deux méthodes d'introduction des gènes chez des malades. Dans les deux cas, les gènes sont d'abord introduits dans des





2. POUR ENTRER DANS UNE CELLULE, un virus doit s'associer à des molécules de surface particulières, ou récepteurs. Le virus de la leucémie de la souris se lie normalement, par l'intermédiaire d'une protéine de son enveloppe, à un récepteur présent chez de nombreux types de cellules (à gauche). En modifiant cette protéine

pour y inclure de nouveaux éléments (au centre) ou en la remplaçant par d'autres protéines (à droite), on dirige le virus vers des cellules qu'il n'infecte normalement pas. Des manipulations semblables permettent à d'autres vecteurs de cibler d'autres types de cellules spécifiques.

vecteurs, qui acheminent les gènes jusque dans les cellules. Dans la méthode *ex vivo*, la plus employée, des cellules sont extraites du tissu à traiter et mises en présence de vecteurs de transfert de gènes ; puis les cellules génétiquement corrigées sont réintroduites chez le patient. Dans le procédé *in vivo*, les vecteurs sont introduits directement dans l'organisme, en général dans le tissu à traiter. Idéalement, on préférerait introduire les vecteurs dans le sang ou dans d'autres sites, d'où ils se dirigeraient d'eux-mêmes vers les cellules ciblées, notamment vers des organes difficiles à atteindre ou vers des zones cancéreuses cachées. Des vecteurs capables de s'orienter ainsi dans le corps humain n'existent pas encore, mais les travaux avancent rapidement.

Dans l'organisme, certains gènes n'ont un effet bénéfique que si leur expression est rigoureusement régulée : ils doivent produire, aux bons moments, l'exacte quantité de protéines nécessaire. Les biologistes ne maîtrisent pas encore à ce point l'expression des gènes étrangers introduits dans l'organisme, mais cela n'est pas gênant pour de nombreuses applications de la thérapie génique. D'autre part, on peut souvent se contenter d'introduire les gènes dans d'autres cellules que les cellules malades. Certaines cellules plus accessibles, telles celles des muscles ou de la peau, sont en effet quelquefois utilisables comme usines à protéines : elles fabriquent les molécules nécessaires, et les transmettent à des cellules voisines ou les libèrent dans le sang, qui les achemine alors vers des organes éloignés.

Quel type de vecteur peut transporter et distribuer les gènes efficacement et sans danger ? L'idée d'utiliser des virus remonte aux origines de la thérapie génique. Les virus sont à peine plus que des gènes capables de se répliquer, entourés d'une enveloppe protéique. L'évolution les a progressivement rendus capables d'entrer dans des cellules et d'y exprimer leurs gènes. Les biologistes savent substituer un ou plusieurs gènes à potentialités thérapeutiques à des gènes de réplication virale ou de virulence. Théoriquement, un virus que l'on a ainsi modifié pour le rendre inoffensif transférerait des gènes bénéfiques dans des cellules sans se reproduire ni provoquer de maladie.

Les virus les plus étudiés sont les rétrovirus, qui insèrent des copies de leurs gènes dans les chromosomes des cellules qu'ils envahissent. Les gènes ainsi intégrés sont ensuite copiés et transmis à toute la descendance de ces cellules. Beaucoup d'autres types de virus n'intègrent pas leur matériel génétique dans les chromosomes des cellules qu'ils infectent. En général, leurs gènes ne sont que temporairement actifs dans l'organisme, notamment parce que ces gènes ne se répliquent pas lorsque les cellules infectées se divisent.

Les cellules souches sont des cibles idéales pour les vecteurs rétroviraux, car ces cellules souches vivent indéfiniment et engendrent des cellules plus spécialisées. Les cellules souches du sang, par exemple, donnent naissance aux différents types de cellules sanguines (globules rouges, globules blancs du système immunitaire...) et peuvent reconstituer le sang ; en outre, elles se reproduisent à l'identique. Aujourd'hui,

toutefois, on identifie difficilement les cellules souches humaines et l'on ne sait pas encore les modifier de façon à la fois prévisible et sûre.

Des rétrovirus modifiés

Les rétrovirus, testés comme vecteurs depuis le début des années 1980, ont de nombreux inconvénients. Tout d'abord, ils sont peu sélectifs : ils déposent leurs gènes dans les chromosomes de cellules variées. De ce fait, l'incorporation de gènes étrangers dans des cellules auxquelles ils n'étaient pas destinés réduit l'impact sur les cellules visées et risque de produire des effets physiologiques indésirables. Toutefois, les rétrovirus ou les autres virus n'apportent leur matériel génétique dans une cellule que si les protéines fixées à leur surface rencontrent des éléments correspondants, ou récepteurs, sur cette cellule. La liaison des protéines virales et des récepteurs cellulaires provoque la fusion de l'enveloppe du rétrovirus avec la membrane cellulaire, et la libération des protéines et des gènes viraux à l'intérieur de la cellule. On tente donc d'accroître la sélectivité des rétrovirus envers les cellules qu'ils envahissent par le remplacement ou la modification des protéines de leur surface, ou par l'ajout à celle-ci de nouvelles protéines ou parties de protéines.

Ainsi, mon collègue Jiing-Kuan Yee a modifié le virus de la leucémie de la souris, remplaçant la protéine de surface par celle du virus de la stomatite vésiculaire humaine (une infection de la bouche). Le virus de la souris, apparemment inoffensif pour l'homme, est le rétrovirus le plus étudié comme vec-

teur de thérapie génique. Ainsi modifié, il a pénétré dans des cellules qui portaient des récepteurs du virus de la stomatite vésiculaire humaine et n'a pas infecté des cellules qui portaient des récepteurs du virus de la leucémie. Yuet Wai Kan et ses collègues de l'Université de San Francisco ont récemment lié une hormone aux protéines de l'enveloppe du même virus de la leucémie, permettant ainsi à celui-ci d'infecter spécifiquement des cellules humaines porteuses du récepteur de l'hormone.

Les rétrovirus ont un autre défaut : ils ne propagent leurs gènes que lors des divisions cellulaires, lorsque la membrane entourant le noyau de la cellule infectée disparaît. Ils ne peuvent donc pas modifier les cellules

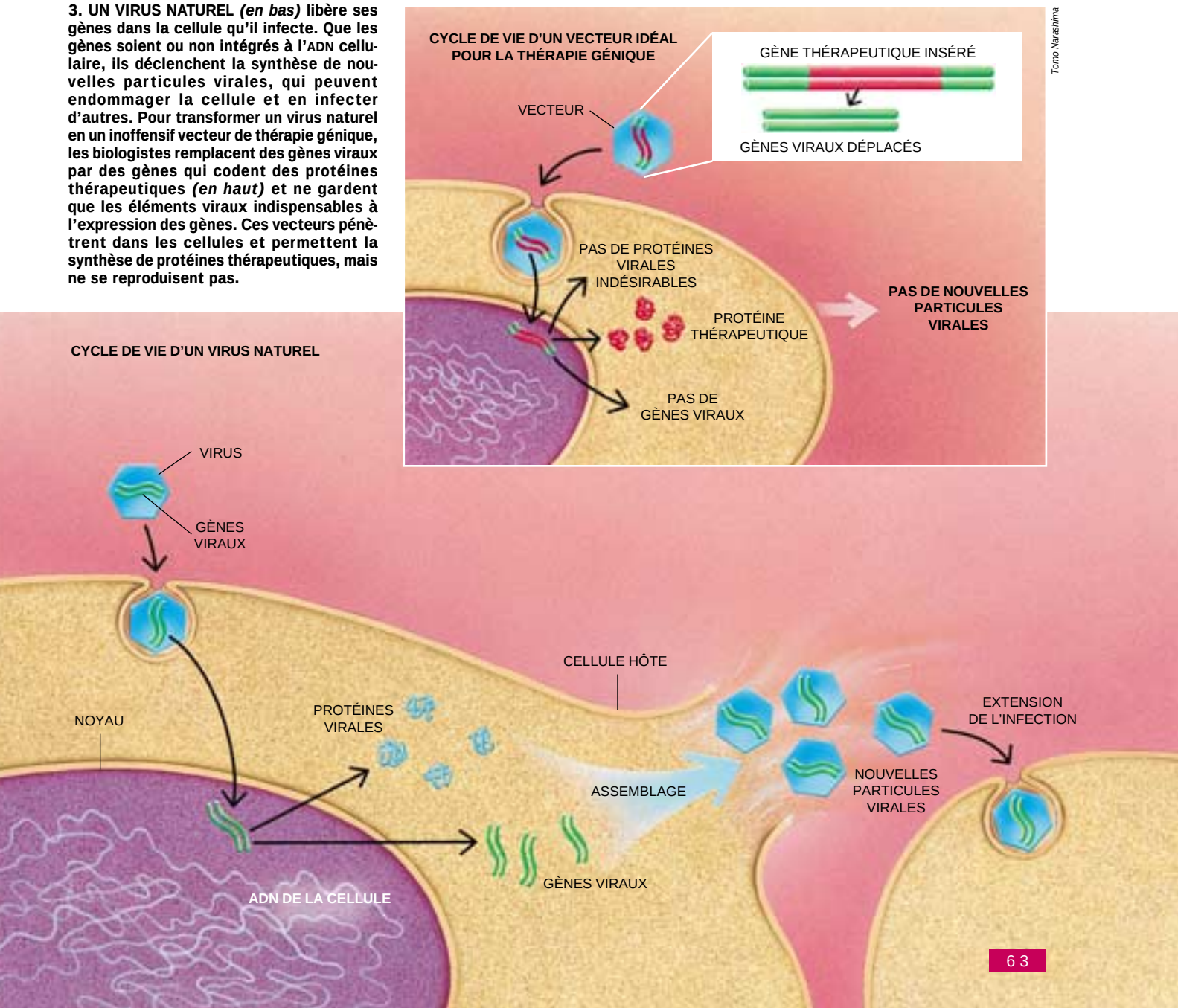
qui ne se divisent pas, ou qui ne le font que rarement (tels les neurones à l'état mature et les cellules des muscles).

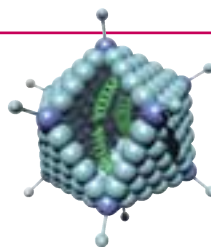
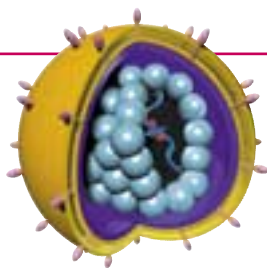
Afin de pallier cette difficulté, Inder Verma, Didier Trono et leurs collègues de l'Institut Salk ont utilisé le VIH, qui introduit ses gènes dans le noyau des neurones, sans attendre que l'enveloppe nucléaire disparaisse au cours d'une division cellulaire. Les biologistes ont extrait les gènes qui permettraient au VIH de se reproduire et leur ont substitué un gène qui code une protéine facile à détecter. Le gène marqué a été introduit dans des neurones, qui ne se divisent pas, d'abord par simple mélange du vecteur viral et de cellules en culture, puis par injection directe du vecteur dans le cerveau de rats. Le VIH

pourra être utilisé comme vecteur chez l'homme quand nous serons certains qu'ainsi désactivé il ne redeviendra pas pathogène, mais on pourrait aussi transférer dans des rétrovirus inoffensifs pour l'homme certains des gènes du VIH, tels ceux qui codent les protéines transportant les gènes jusqu'au noyau.

Enfin, on cherche à éviter que les rétrovirus n'insèrent les gènes au hasard dans les chromosomes de l'hôte : selon le lieu d'insertion, d'autres gènes peuvent être cassés ou modifiés. Le risque de cancer dû à ces ruptures, bien que faible, existe. L'étude de l'intégration des gènes étrangers dans des levures, par exemple, semble indiquer progressivement des moyens de mieux guider cette intégration.

3. UN VIRUS NATUREL (*en bas*) libère ses gènes dans la cellule qu'il infecte. Que les gènes soient ou non intégrés à l'ADN cellulaire, ils déclenchent la synthèse de nouvelles particules virales, qui peuvent endommager la cellule et en infecter d'autres. Pour transformer un virus naturel en un inoffensif vecteur de thérapie génique, les biologistes remplacent des gènes viraux par des gènes qui codent des protéines thérapeutiques (*en haut*) et ne gardent que les éléments viraux indispensables à l'expression des gènes. Ces vecteurs pénètrent dans les cellules et permettent la synthèse de protéines thérapeutiques, mais ne se reproduisent pas.





	Rétrovirus	Adénovirus	Virus associés aux adénovirus	Liposomes	ADN nu
Avantages potentiels	Intègrent les gènes dans les chromosomes hôtes avec une stabilité à long terme.	La plupart ne provoquent pas de maladies graves ; grande capacité pour les gènes étrangers.	Intègrent les gènes dans les chromosomes hôtes ; n'entraînent pas de maladie connue.	Dépourvus de gènes viraux, ils ne provoquent pas de maladie.	Avantages identiques à ceux des liposomes ; sans doute utile pour la vaccination.
Inconvénients actuels	Intégration aléatoire des gènes : risquent d'endommager des gènes hôtes. Beaucoup d'entre eux n'infectent que des cellules en cours de division.	Les gènes peuvent n'être actifs que transitoirement, soit par défaut d'intégration, soit par réaction du système immunitaire.	Faible capacité pour les gènes étrangers.	Moins efficaces que les virus pour transférer les gènes aux cellules.	Inefficace pour le transfert de gènes ; instable dans la plupart des tissus de l'organisme.

Slim Films

4. LES VECTEURS VIRAUX et non viraux à l'étude ont chacun des avantages et des inconvénients, qui les rendent plus ou moins adaptés au traitement de différentes maladies.

Du rhume à la thérapie génique

D'autres virus que les rétrovirus ont d'autres avantages, et aussi d'autres inconvénients. Les plus fréquemment utilisés, après les rétrovirus, sont les adénovirus humains, car ils sont parfaitement inoffensifs : chez des personnes en bonne santé, ils n'entraînent normalement que des rhumes. De plus, ils infectent facilement les cellules humaines et conduisent à la synthèse de quantités importantes de la protéine thérapeutique, pendant quelque temps après l'infection.

Les adénovirus transportent les gènes jusqu'au noyau, mais, apparemment, ne les insèrent pas dans des chromosomes : on évite ainsi le risque de dégradation de gènes cellulaires essentiels et de cancer. Souvent, toutefois, ces gènes n'ont qu'une activité temporaire. Comme l'ADN finit par disparaître, les traitements de maladies chroniques, telle la mucoviscidose, doivent être renouvelés mensuellement ou annuellement. Cet inconvénient devient parfois un avantage : pour déclencher temporairement une réaction immunitaire contre un cancer ou un agent pathogène, une brève activité du gène étranger est préférable.

Les adénovirus ont le même manque de sélectivité que les rétrovirus ; les mêmes types de solutions

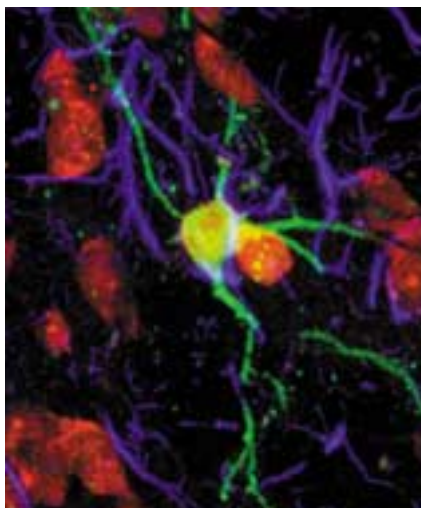
sont actuellement testés. Aujourd'hui, l'obstacle le plus sérieux à l'utilisation des adénovirus comme vecteurs chez des malades est la réaction immunitaire énergique qu'ils provoquent. Au cours d'un premier traitement, ces vecteurs atteignent les cellules souhaitées et déclenchent la fabrication de grandes quantités des protéines désirées. Cependant les défenses de l'hôte tuent rapidement les cellules modifiées et inactivent leurs nouveaux gènes. Si les virus sont administrés une seconde fois, le système immunitaire les élimine encore plus rapidement. Ces réactions sont probablement responsables de la disparition de l'expression des gènes, observée dans de nombreuses études cliniques de transfert de gènes par des adénovirus. On cherche aujourd'hui à réduire la réaction immunitaire en enlevant ou en modifiant les gènes viraux qui en étaient les principaux responsables.

D'autres virus pourraient servir de vecteurs : les virus associés aux adénovirus, les herpèsvirus, les alphavirus et les poxvirus. Aucun n'est idéal, mais chacun aurait des applications spécifiques. Les virus associés aux adénovirus sont inoffensifs pour l'homme, et ils intègrent naturellement leurs gènes dans les chromosomes humains : ils pourraient remplacer les rétrovirus, avec la réserve que, plus petits, ils ne pour-

raient introduire des gènes de grande taille. Les herpèsvirus n'intègrent pas leurs gènes dans l'ADN de leurs hôtes, mais ils sont attirés vers les neurones, dont certains les maintiennent dans un état à peu près inoffensif pendant la durée de vie de la personne atteinte : ils seraient de bons vecteurs pour traiter des maladies neurologiques.

Les virus ne sont pas les seuls vecteurs potentiels. On fabrique des agents synthétiques en combinant de l'ADN avec des molécules qui le condensent, le transportent vers les cellules et, à l'intérieur de celles-ci, le protègent des dégradations. Comme celle des virus, leur utilisation thérapeutique requiert encore des perfectionnements. Les gènes transportés par des vecteurs non viraux s'intègrent bien aux chromosomes des cellules hôtes en laboratoire, mais mal dans l'organisme. Comme nous l'avons déjà vu, ce défaut d'intégration peut être un avantage ou un inconvénient, selon l'objectif de chaque thérapie.

Les liposomes, de petites sphères composées de molécules de graisses analogues à celles des parois cellulaires (des lipides) sont étudiés depuis presque aussi longtemps que les rétrovirus. On sait y loger un plasmide, boucle stable d'ADN provenant de virus des bactéries nommés bactériophages, dont les gènes d'origine ont été remplacés par ceux dont on attend un effet



5. CE NEURONE HUMAIN a absorbé un vecteur viral construit à partir du virus du SIDA : on a éliminé les éléments les plus dangereux et ajouté un gène qui code une protéine repérable (en jaune). Des formes inactivées d'un rétrovirus tel que le VIH pourraient introduire des gènes thérapeutiques dans des neurones, dont l'incapacité à se diviser les rend résistants aux autres rétrovirus.

thérapeutique. Le transfert de gènes par des liposomes est bien moins efficace que celui effectué par les virus, mais sa mise au point est suffisamment avancée pour que ces vecteurs abordent la phase des essais cliniques contre certaines affections, tels le cancer et la mucoviscidose. Des modifications de la composition chimique des liposomes améliorent leur sélectivité et leur efficacité dans le transfert de gènes.

L'ADN peut aussi être transporté par des agrégats de molécules variées, tels les peptides (des enchaînements de quelques acides aminés), qui se lient à des cellules cibles et bloquent sa dégradation par les enzymes cellulaires. Ces «complexes» donnent de bons résultats *in vitro* ; on les modifie afin de les tester sur des animaux et chez des patients.

L'injection d'ADN nu donne également d'intéressantes possibilités d'immunisation contre les maladies infectieuses, voire contre certaines formes de cancers. Et d'autres formes d'ADN que les plasmides sont également à l'étude : les biologistes essaient notamment de construire des chromosomes miniatures, où ils inséreraient des gènes thérapeutiques. Ces assemblages contiendront juste la quantité de matériel génétique nécessaire pour éviter sa dégradation dans le noyau et sa disparition au cours de la division cellulaire. Ils contiendront aussi

des éléments leur permettant de se répliquer fidèlement (et une seule fois) à chaque division cellulaire, comme un vrai chromosome.

Lorsqu'ils seront au point, les différents types de vecteurs seront utilisés pour des traitements différents. Si une personne porteuse d'une anomalie génétique a besoin de recevoir pendant toute sa vie le produit du gène normal, on préférera un vecteur qui insérera de façon permanente le gène thérapeutique dans ses chromosomes : un rétrovirus ou un virus associé aux adénovirus. Pour une activité à court terme, par exemple pour provoquer une réaction immunitaire contre des cellules cancéreuses ou contre un agent infectieux, on emploiera des vecteurs qui n'insèrent pas leurs chromosomes, tels des adénovirus, des liposomes ou de l'ADN nu. Les vecteurs que nous utiliserons demain ne ressembleront toutefois que de loin aux prototypes que nous testons aujourd'hui.

La mise au point de vecteurs n'est pas la seule réalisation nécessaire à la thérapie génique. Les biologistes devront éviter l'inactivation des gènes étrangers par les cellules où ils sont introduits, et limiter la réaction immunitaire contre des protéines apparemment étrangères. Pour empêcher toute réaction immunitaire inactivante, les médecins pourraient administrer des substances antirejet à certains malades ou obtenir une tolérance immunitaire à l'égard de la protéine en entreprenant une thérapie génique très tôt dans la vie du malade, avant que le système immunitaire ne soit devenu opérationnel.

Theodore FRIEDMANN dirige le programme de thérapie génique et est professeur de pédiatrie et d'éthique biomédicale à l'Université de San Diego.

I. VERMA, *La thérapie génique, Pour la Science*, janvier 1991.

M. PERRICAUDET, L. SCHAFFAR et T. TURZ, *La thérapie génique par adénovirus, Pour la Science*, octobre 1994.

M.K. BRENNER, *Human Somatic Gene Therapy : Progress and Problems*, in *Journal of Internal Medicine*, vol. 237, n° 3, pp. 229-239, mars 1995.

Recombinant DNA Research, Agency : National Institutes of Health, *Federal Register*, vol. 61, n° 131, pp. 35774-35777, lundi 8 juillet 1996.

La thérapie génique sans virus

PHILIP FELGNER

On cherche à éviter l'usage de virus pour introduire de l'ADN chez des malades. Les études débouchent sur la mise au point de vaccins.

De nombreuses équipes qui étudient la thérapie génique emploient des virus modifiés pour acheminer, dans les cellules humaines, des gènes qui codent des protéines potentiellement thérapeutiques. Ainsi les cellules peuvent exprimer les gènes introduits, c'est-à-dire fabriquer les protéines codées par les gènes.

Les virus sont de bons vecteurs de gènes, car l'évolution leur a progressivement permis de s'introduire dans certains types de cellules. Néanmoins, les virus ne sont pas des vecteurs idéaux pour la thérapie génique : certains virus endommagent les cellules qu'ils infectent, en perturbant leur ADN, ou risquent de retrouver leur activité pathogène lors de leur séjour dans l'organisme ; ils risquent en outre de provoquer des réactions immunitaires qui détruisent ou qui tuent les cellules infectées avant que le gène thérapeutique n'ait amélioré l'état des malades.

Pourrait-on apporter les gènes thérapeutiques aux cellules sans utiliser d'agents infectieux ? Quelques équipes européennes ou américaines testent des complexes constitués d'ADN et de lipides qui ne déclenchent pas de réaction immunitaire. De surcroît, on a observé que des injections expérimentales d'ADN «nu», chez l'animal et chez l'homme, déclenchent l'expression des protéines codées par l'ADN injecté. Cette observation intéresse beaucoup ceux qui explorent de nouveaux vaccins.

Les biologistes cherchent depuis longtemps à modifier des cellules en y introduisant de l'ADN. Dès les années 1950, des biologistes avaient montré que des cellules pouvaient absorber des acides nucléiques (ADN ou ARN) d'ori-

gine virale et les exprimer sous forme de protéines. Comment améliorer l'efficacité de la modification génétique des cellules ? Vers les années 1960, on découvrit que l'obstacle principal à cette insertion d'ADN était électrique : dans un milieu aqueux, tel le fluide extracellulaire de l'organisme, les molécules d'ADN sont négativement chargées, de sorte qu'elles sont repoussées par les membranes cellulaires, de même charge électrique. Pour faciliter l'absorption de l'ADN par les cellules, les biologistes ont alors cherché à associer l'ADN à des composés qui le rendent électriquement neutre : un polymère organique chargé positivement, le DEAE-dextrane, et le phosphate de calcium.

Des cellules humaines en culture captaient l'ADN associé à ces composés et exprimaient les gènes introduits de façon permanente. Par exemple, certaines cellules incorporèrent le gène de la thymidine kinase, isolé du virus de l'herpès simplex, quand il fut complexé par le phosphate de calcium : elles produisirent ensuite, pendant longtemps, la protéine codée par le gène supplémentaire.

Puis, vers la fin des années 1970, des biologistes découvrirent des techniques pour prélever des gènes précis dans les cellules et les intégrer dans des plasmides, des boucles d'ADN qui se multiplient naturellement à l'intérieur des bactéries. Par des techniques de recombinaison de l'ADN, le génie génétique apprit à produire un grand nombre de copies de gènes spécifiques. Paul Berg et ses collègues de l'Université Stanford introduisirent alors des plasmides recombinés d'origine bactérienne dans des cellules de mammifères en culture.

L'expression des gènes intégrés à ces plasmides révéla qu'ils étaient parvenus jusqu'au noyau des cellules, car les gènes ne sont généralement pas exprimés sans l'intervention des protéines nucléaires. L'industrie pharmaceutique utilisa les méthodes de transformation non virale pour créer des lignées de cellules de mammifères avec lesquelles elle produit aujourd'hui des protéines thérapeutiques, tel le facteur VIII, administré aux hémophiles contre leurs troubles de la coagulation.

Les graisses et l'ADN

De nombreux biologistes pensaient que les techniques ainsi mises au point seraient inefficaces pour la thérapie génique. Cependant, P. Berg et Demetrios Papahadjopoulos, de l'Université de San Francisco, introduisirent des gènes dans des cellules en mettant celles-ci en présence de liposomes où de l'ADN était inclus (les liposomes sont de minuscules sphères creuses, pleines d'une solution aqueuse, limitées par une membrane lipidique) ; les gènes des plasmides arrivaient jusqu'au noyau, où la machinerie cellulaire les traduisait en protéines.

Depuis 1960 environ, on sait obtenir des liposomes en dispersant dans une solution aqueuse des lipides qui possèdent une extrémité hydrophile (soluble dans l'eau) et une extrémité hydrophobe (insoluble) : spontanément, ces molécules regroupent leurs parties hydrophobes, formant une double couche qui se referme en sphère. Comme les liposomes ont le même type de membrane que les cellules, ils fusionnent avec les cellules et libèrent dans

ces dernières les substances thérapeutiques dont ils sont chargés.

Malgré des résultats encourageants, les liposomes semblaient de mauvais vecteurs de gènes, car leur diamètre interne – compris entre 0,025 et 0,1 micromètre – est bien inférieur au diamètre des plasmides, qui peut atteindre deux micromètres ; lorsque des liposomes étaient synthétisés en présence de plasmides, seuls quelques plasmides très entortillés étaient encapsulés. Pouvaient-on modifier les liposomes pour qu'ils piègent mieux les plasmides et transmettent plus facilement leur contenu aux cellules ?

Avec mes collègues des Laboratoires de recherche Syntex, nous avons alors pensé à construire des liposomes où certains lipides classiques seraient remplacés par des lipides portant une charge positive à leur extrémité hydrophile : nous espérions que ces molécules captteraient mieux les plasmides, au cours de la for-

mation des liposomes, et que les liposomes formés se lieraient davantage aux membranes cellulaires. Cependant, en 1983, on connaissait peu de lipides chargés positivement et capables de s'organiser en liposomes.

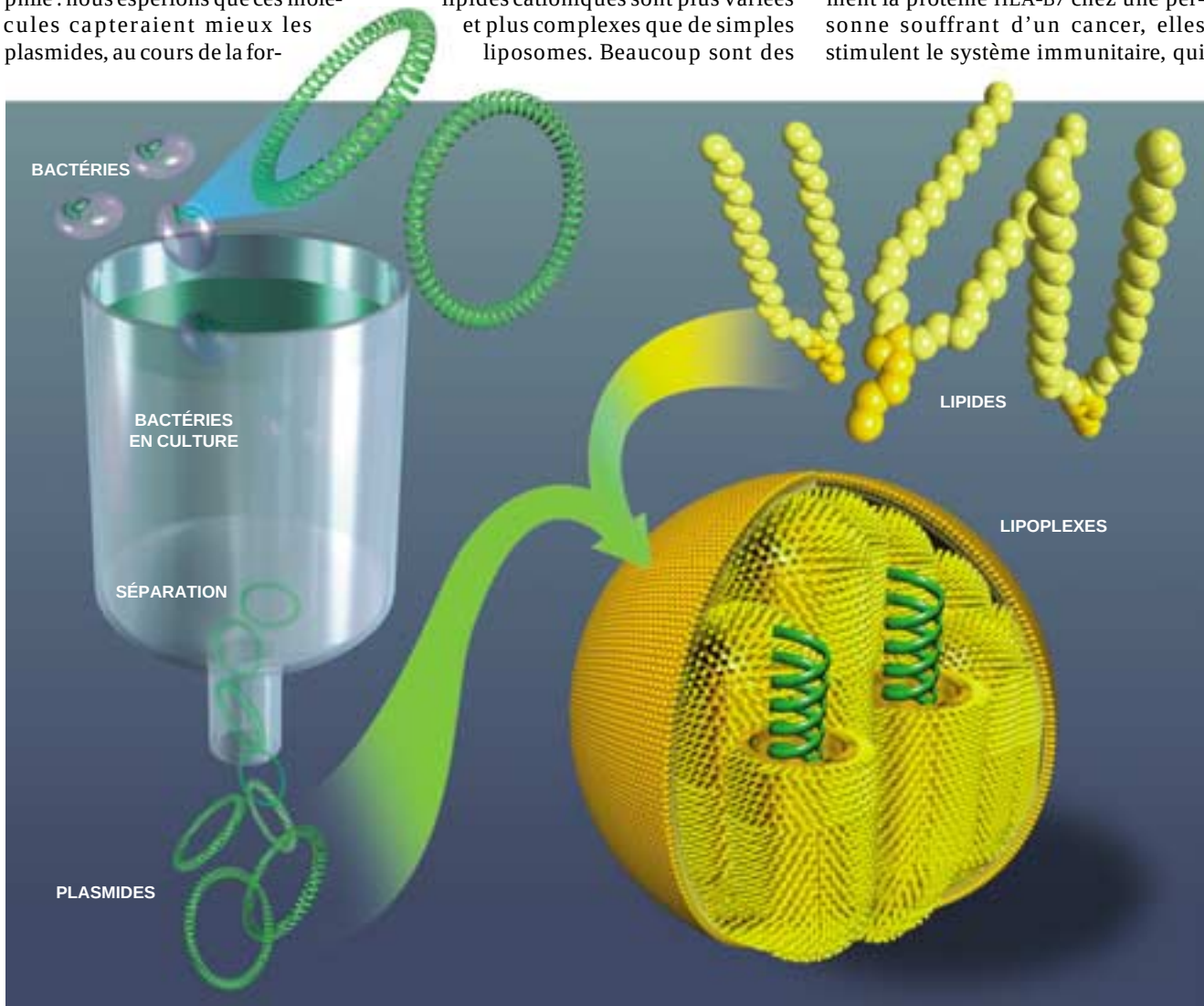
L'exploitation de la découverte

Les lipides cationiques que nous avons alors conçus et réalisés se comportèrent comme nous l'espérions : d'une part, les liposomes cationiques qui en résultèrent se fixaient solidement à la paroi des cellules en culture ; d'autre part, en mélangeant simplement des plasmides avec environ huit fois leur masse en lipides cationiques, nous sommes parvenus à piéger tout les plasmides.

Toutefois, les structures formées par le mélange de plasmides et de lipides cationiques sont plus variées et plus complexes que de simples liposomes. Beaucoup sont des

structures lipidiques tubulaires où sont piégés les plasmides. Dans certaines conditions, un tube lipidique contenant un plasmide se replie et forme une particule dense, à paroi lipidique, qui ressemble un peu à certains virus. Comme les molécules issues de lipides cationiques diffèrent des liposomes ordinaires, les biologistes les ont nommées lipoplexes.

Je prévoyais de modifier les lipoplexes afin qu'ils puissent livrer leur «chargement» dans les cellules, mais un étudiant de mon laboratoire a constaté que ces structures rudimentaires modifiaient efficacement les cellules. Les premières utilisations des lipoplexes en thérapie génique humaine sont récentes. On a notamment testé des lipoplexes chargés d'un ADN qui code la protéine HLA-B7 du système immunitaire. Lorsque des cellules cancéreuses expriment la protéine HLA-B7 chez une personne souffrant d'un cancer, elles stimulent le système immunitaire, qui



Slim Films, d'après Bruce P. Graber, Naval Research Laboratory

1. POUR FABRIQUER DES LIPOPLEXES qui seront utilisés en thérapie génique, on commence par produire des plasmides à l'aide de bactéries (à gauche). Lorsque l'on mélange ces plasmides à des lipides, les molécules s'agrègent spontanément en lipoplexes.

les reconnaît comme étrangères et les détruit sélectivement. Plus de 90 patients qui n'avaient pas réagi aux traitements anticancéreux classiques ont été traités selon les protocoles cliniques établis par les Laboratoires *Vical* et ont subi des injections intratumorales de lipoplexes porteurs d'un ADN qui code la protéine HLA-B7.

Dans la plupart des cas, le traitement stimula la production de la protéine HLA-B7. Chez 20 des 60 personnes atteintes d'un mélanome malin (un cancer de la peau), la tumeur diminua ou disparut après l'injection des lipoplexes. Les mélanomes évolués se disséminent souvent dans tout l'organisme, si bien que les injections de substances thérapeutiques sur les tumeurs visibles sont *a priori* insuffisantes, mais nos résultats préliminaires indiquent que les lipoplexes font parfois régresser des tumeurs même là où les lipoplexes n'ont pas été injectés. Nous étudions aujourd'hui l'intérêt des lipoplexes porteurs du gène qui code la protéine HLA-B7 contre les cancers inopérables du côlon, du rein et du sein.

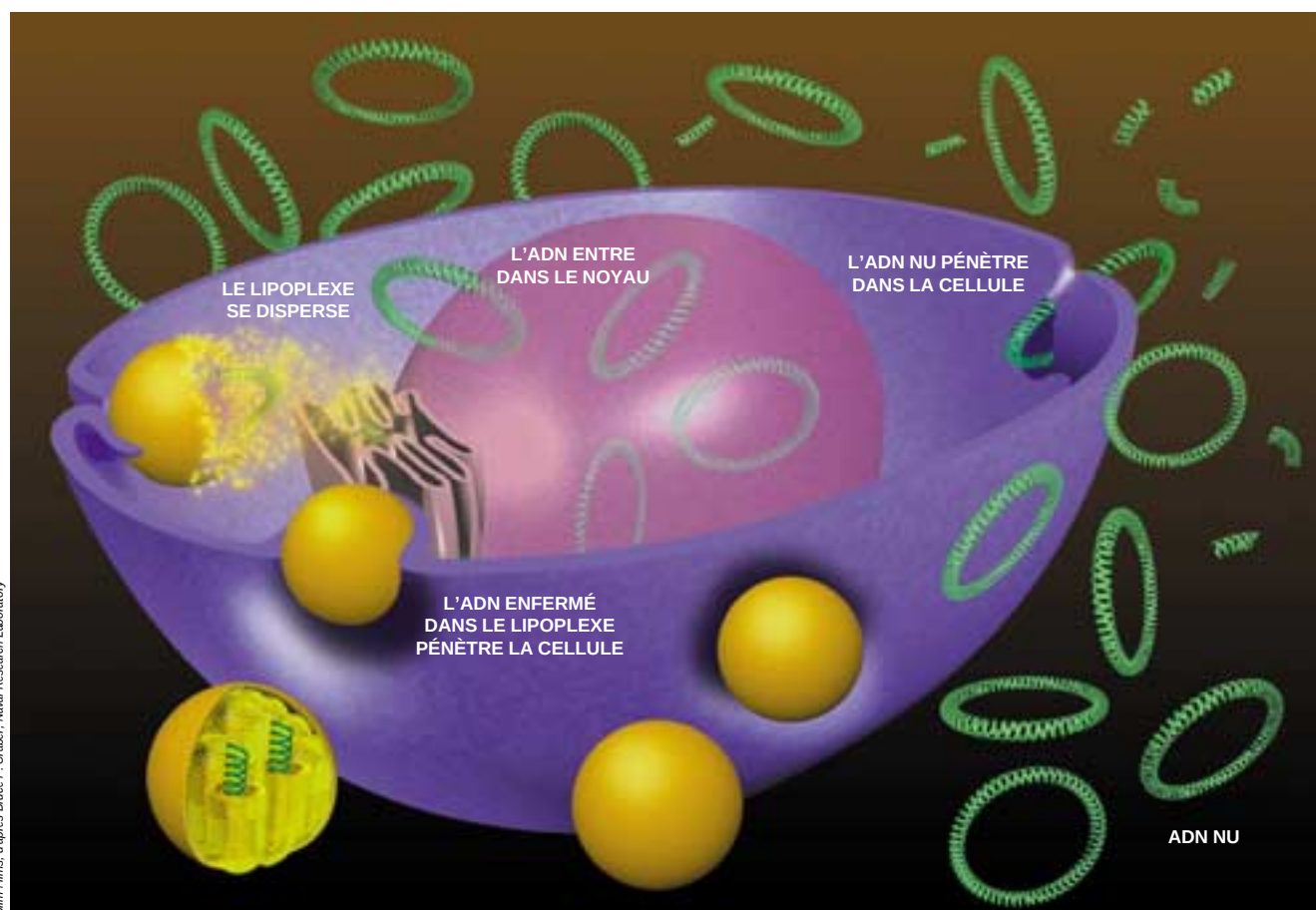
Les Laboratoires *Vical* ont également lancé une série d'essais cliniques avec des lipoplexes porteurs du gène de l'interleukine 2 (IL-2), une protéine qui transmet des signaux entre divers constituants du système immunitaire. Habituellement, les personnes atteintes d'un cancer du rein sont traitées par perfusion intraveineuse d'interleukine 2, mais les injections provoquent des effets secondaires. Injectés directement dans la tumeur, les lipoplexes stimuleraient le système immunitaire en augmentant localement la concentration d'interleukine 2, sans entraîner la plupart des effets secondaires nocifs.

D'autre part, la Société *Genzyme General Division* teste des lipoplexes chez des personnes atteintes de mucoviscidose : les molécules d'ADN contiennent un gène qui code la protéine déficiente (CFTR pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, soit «régulateur de la conductance membranaire de la mucoviscidose»). Les lipoplexes en solution sont dispersés directement dans les poumons des malades sous la forme d'aérosols, et l'expression de la

protéine devrait atténuer certains des symptômes les plus graves.

Dans certains des cas étudiés, les lipoplexes conduisent à une expression de gènes introduits aussi bonne qu'avec des virus, mais l'efficacité de «transfection» par ces derniers est bien supérieure. Certains virus ont un rendement de 100 pour cent : 1 000 virus modifient 1 000 cellules. Avec des lipoplexes, la modification génétique de 1 000 cellules nécessiterait environ 10 millions de copies du gène transportées par 10 millions de lipoplexes, ce qui rend les lipoplexes 10 000 fois moins efficaces que les vecteurs viraux.

Pour améliorer l'efficacité des lipoplexes, on fixe à leur surface des protéines spécifiques ou des fragments protéiques semblables à ceux grâce auxquels les virus se fixent sur des types de cellules particuliers. On envisage aussi d'inclure dans les lipoplexes d'autres molécules qui protégeraient les gènes introduits et favoriseraient leur expression dans les cellules modifiées : des protéines virales membranaires dites de fusion permettraient aux lipoplexes



Slim Films, d'après Bruce P. Graber, Naval Research Laboratory

2. LES LIPIDES DES LIPOPLEXES permettent à l'ADN de pénétrer dans une cellule (à gauche et devant), avant que les éléments de cette dernière ne dispersent les lipides. Dans certaines conditions, de l'ADN nu (à droite) pénètre directement dans les cellules, par une déchirure.

de se soustraire au système intracellulaire d'élimination ; des protéines virales faciliteraient la progression des gènes viraux vers le noyau cellulaire.

Parallèlement, divers laboratoires poursuivent leurs travaux sur l'ADN nu. Vers la fin des années 1980, bien avant le début des essais cliniques avec les lipoplexes, plusieurs équipes ont fait une surprenante découverte. Avec Jon Wolff et Robert Malone, par exemple, nous cherchions des lipides pour transporter efficacement les gènes dans des cellules, et nous avons choisi de mesurer l'expression d'un gène précis, facile à pister, après son injection à l'aide de lipoplexes.

En analysant les résultats de notre première expérience sur des tissus de souris, nous remarquâmes que l'expression du gène dans des muscles était aussi bonne qu'*in vitro*, mais il apparut surtout que l'ADN nu, que nous avions utilisé comme contrôle, s'exprimait aussi bien, voire mieux, que l'ADN associé aux lipides.

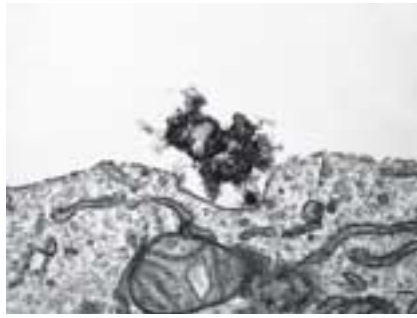
L'ADN nu

Nous avons répété ces expériences plusieurs fois dans nos différents laboratoires et confirmé l'étonnante observation : de l'ADN nu, injecté dans le muscle d'un animal, s'exprime et fait synthétiser des quantités notables de la protéine codée (parfois plus de 100 nanogrammes par gramme de tissu musculaire).

Ainsi, malgré les répulsions électriques entre les parois cellulaires et l'ADN, certaines cellules absorbent la molécule. On ignore encore le mécanisme d'assimilation, mais on soupçonne que celle-ci s'effectue là où le tissu est endommagé ou bien parce que la pression augmente au site d'injection.

On a alors envisagé l'injection d'ADN nu dans les muscles de malades, afin de produire des protéines déficientes : de l'insuline pour traiter le diabète ou des protéines de la coagulation, tels les facteurs VIII ou IX, contre l'hémophilie. Cependant, les quantités de protéines produites dans les muscles étaient insuffisantes : après dilution dans les trois litres de sang, la concentration en protéine dans les organes malades était trop faible.

De nouveaux plasmides ont dernièrement donné des résultats encourageants : chez des souris nous avons stimulé la production des globules



3. UN LIPOPLEXE est assimilé par une cellule en culture. Les lipides positivement chargés du lipoplexe protègent l'ADN et lui font traverser la membrane cellulaire, évitant la répulsion électrique de l'ADN et de la membrane, qui portent tous deux une charge négative.



4. APRÈS UNE INJECTION DE PLASMIDES NUS, un muscle de souris fabrique la protéine codée par le plasmide. Dans l'expérience montrée ici, la protéine codée entraînait une coloration bleue.

rouges par des injections de plasmides nus codant l'érythropoïétine (cette hormone est utilisée pour favoriser la synthèse de nouveaux globules rouges chez des patients ayant subi une chimiothérapie ou une radiothérapie). Peut-être, dans le futur, des injections musculaires de plasmides recombinés pourront-elles remplacer l'administration de l'érythropoïétine elle-même.

À plus court terme, l'ADN nu semble être un composé de vaccin prometteur, car même des quantités infimes de protéines stimulent une réaction immunitaire protectrice. Les protéines engendrent deux sortes d'immunité. La première, l'immunité humorale, apparaît après l'élimination d'un agent pathogène par le système immunitaire. Les micro-organismes détruits sont capturés par des cellules spécialisées, qui présentent les protéines étrangères à des globules blancs nommés lymphocytes B. Ces derniers sécrètent alors des anticorps, qui se lient aux protéines étrangères détectées. Ultérieurement, dès que les anticorps rencontrent à nouveau le micro-organisme pathogène, il s'y associent rapidement, le neutralisant ou le marquant, de manière que d'autres éléments du système immunitaire le détruisent.

La seconde réaction, l'immunité cellulaire, intervient lorsque des virus

envahissent des cellules et leur font produire de nouvelles particules virales. Des fragments de protéines virales sont alors disséminés sur la surface des cellules infectées. Le système immunitaire réagit cette fois en produisant des lymphocytes T, qui reconnaissent ces fragments. Ces lymphocytes T ne produisent pas d'anticorps, mais détruisent directement les cellules qui portent les fragments étrangers. Lorsque l'organisme est à nouveau envahi par le même agent pathogène, les cellules infectées qui portent ces fragments sont immédiatement détruites.

Avec Dennis Carson, de l'Université de San Diego, nous avons considéré que les plasmides nus, puisqu'ils envahissent des cellules, devraient stimuler à la fois l'immunité cellulaire et l'immunité humorale. La première expérience montra que, quand on injectait à des souris un plasmide qui codait une protéine de l'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ces souris produisaient des anticorps qui se liaient à la protéine virale. En outre, les plasmides déclenchaient également une réaction immunitaire cellulaire : *in vitro*, les lymphocytes T de ces souris attaquaient des cellules qui présentaient des fragments des protéines virales.



Peter Yates, SGA

5. DES LIPOPLEXES à propriétés anticancéreuses sont administrés à une patiente atteinte d'un mélanome. Ils font produire une protéine que le système immunitaire reconnaît comme étrangère, ce qui permet l'élimination des cellules malades.

Vers des vaccins géniques

Les espoirs nés de ces études ont été confirmés lorsque ma collègue Suezanne Parker montra que des plasmides qui portent un gène du virus de la grippe protégeaient des souris contre des doses de virus qui auraient été normalement létales. Margaret Liu et ses collègues de la Société Merck ont confirmé ces observations et les ont utilisées pour mettre au point plusieurs vaccins qui ont déclenché des réactions cellulaires et humorales durables. La Société Merck procède aujourd'hui aux essais cliniques de ce vaccin à ADN nu contre la grippe.

D'autres laboratoires étudient des vaccins analogues contre l'herpès, le paludisme et le SIDA. Ultérieurement on étudiera d'autres cibles, comme la tuberculose, le papillome, les chlamydia et l'hépatite. Outre leur rôle préventif, de tels vaccins stimuleraient les systèmes immunitaires des personnes déjà atteintes. Enfin, on prévoit également un essai clinique à partir d'ADN nu contre le lymphome (un cancer des globules blancs).

Les lipoplexes et les plasmides nus ne sont pas les seuls vecteurs non viraux de la thérapie génique. Les biologistes étudient aussi des polymères cationiques qui forment des complexes avec l'ADN. Ces structures, nommées polyplexes, sont également prometteuses.

Les spécialistes de la thérapie génique non virale s'efforcent de mettre au point des vecteurs qui, après injection dans la circulation sanguine, transporteraient leurs séquences

d'ADN aux tissus appropriés tels que poumons, foie, rate ou moelle osseuse. Trouveront-ils des vecteurs géniques absorbables par voie orale? Concevront-ils des vecteurs qui reconnaîtront spécifiquement les cellules tumorales afin d'améliorer le traitement des cancers. Sauront-ils corriger des gènes mutés, portés par les cellules de personnes atteintes de maladies génétiques ou de cancer?

La thérapie génique cellulaire à base de lipoplexes, de polyplexes ou d'ADN nu se développe. Si la progression actuelle se maintient, de nombreux produits de cette sorte, administrés couramment pour traiter et prévenir des maladies classiques, apparaîtront dans les prochaines décennies.

Philippe FELGNER est chercheur aux Laboratoires Vical, à San Diego.

Jon A. WOLFF, Robert W. MALONE, Phillip WILLIAMS, Wang CHONG, Gyula ACSADI, Agnes JANI et Philip L. FELGNER, *Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in vivo*, in *Science*, vol. 247, pp. 1465-1468, 23 mars 1990.

G.J. NABEL et P.L. FELGNER, *Direct Gene Transfer for Immunotherapy*, in *Trends in Biotechnology*, vol. 11, n° 5, pp. 211-215, mai 1993.

J.J. DONNELLY, J.B. ULMER, J.W. SHIVER et M.A. LIU, *DNA Vaccines*, in *Annual Review of Immunology*, vol. 15, pp. 617-648, 1997.

R.J. LEE et L. HUANG, *Lipidic Vector System for Gene Transfer*, in *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 14, n° 2, pp. 173-206, 1997.

Production de médicaments par génie génétique

GABOR STIEGLER • GEORG-BURKHARD KRESSE • PETER BUCKEL

Par les techniques de génie génétique, on obtient des protéines identiques à celles que synthétise l'organisme humain. On envisage de modifier les organismes malades, afin qu'ils produisent eux-mêmes les protéines dont ils manquent.

Le génie génétique s'impose aujourd'hui pour la recherche et la production de nouveaux médicaments, vaccins et moyens de diagnostic. On utilise des bactéries pour produire industriellement des antibiotiques depuis près de 50 ans, mais, aujourd'hui, le génie génétique fabrique des protéines humaines et animales ainsi que des peptides (c'est-à-dire des chaînes d'acides aminés plus courtes que les protéines) utilisés comme médicaments ; c'est un progrès, car on ne sait pas synthétiser des quantités suffisantes de ces molécules par les méthodes de synthèse classiques.

Depuis longtemps, on isole diverses protéines thérapeutiques du sang, de l'urine et de tissus animaux ou humains, et l'on traite des carences congénitales ou acquises par ces molécules. L'insuline extraite du pancréas de porc, par exemple, corrige le métabolisme anormal des sucres chez les diabétiques insulino-dépendants, dont le pancréas ne synthétise pas assez de cette hormone.

Toutefois, les protéines animales diffèrent des protéines humaines, de sorte qu'elles déclenchent souvent des réactions immunitaires. Par les techniques biochimiques classiques, on réussit rarement à les modifier pour leur conférer la forme humaine (on sait le faire pour l'insuline de porc). De plus, on ne dispose pas d'assez de tissus humains pour en extraire des protéines, et l'on risque, par cette méthode, de transmettre des agents

pathogènes aux receveurs. Ainsi, quand on a traité des enfants atteints de nanisme par de l'hormone de croissance extraite d'hypophyses de cadavres, on a transmis, à certains d'entre eux, la maladie de Creutzfeldt-Jakob (une dégénérescence fatale du cerveau) ; et des hémophiles ont été contaminés par le VIH ou par un virus de l'hépatite, par l'intermédiaire de produits sanguins prélevés sur des personnes contaminées.

Seul le génie génétique fournit des protéines humaines pures : à l'aide de bactéries ou de cellules supérieures cultivées dans des fermenteurs, on sait aujourd'hui produire industriellement des protéines présentes dans l'organisme humain à l'état de traces. Les protéines sont définies par l'enchaînement des acides aminés qui les constituent (c'est leur structure primaire), mais aussi par leur agencement dans l'espace. Comme la structure primaire des protéines produites par génie génétique est identique à celle des molécules naturelles, elles risquent peu de déclencher des réactions immunitaires, même lors de traitements de longue durée. En outre, des conditions de culture rigoureusement contrôlées éliminent tout risque de contamination par un agent pathogène.

Dans certains cas, le génie génétique a remplacé les méthodes antérieures de production des protéines (notamment dans le cas de l'hormone de croissance). Dans d'autres cas, il procure des substances, telle l'érythropoïétine, qui sont inaccessibles par les autres techniques.

Enfin, il simplifie notablement la fabrication des vaccins et en augmente la sécurité. Les nouveaux vaccins contre l'hépatite, par exemple, ne contiennent qu'une seule protéine de l'enveloppe du virus, produite dans des cellules de levure modifiées génétiquement. Le succès le plus remarquable du génie génétique est la production de tests diagnostiques, dont les plus récents ne renferment plus que des protéines produites par génie génétique.

Le marché du génie génétique

Le chiffre d'affaires dû au génie génétique en montre l'importance pour la pharmacie. Il y a 15 ans, la Société *Eli-Lilly* commercialisait la première insuline humaine obtenue par génie génétique. Depuis, la proportion des médicaments produits par ces méthodes n'a cessé d'augmenter : leur chiffre d'affaires a triplé entre 1990 et 1995, dépassant 60 milliards de francs ; il devrait à nouveau tripler d'ici l'an 2000. À long terme, le chiffre d'affaires de ces produits sera égal au quart du marché pharmaceutique mondial. En 1996, 32 médicaments produits par génie génétique ont été mis sur le marché mondial.

Certaines petites entreprises qui utilisent les techniques de biologie moléculaire les plus récentes sont particulièrement actives : on estime qu'en l'an 2002 près de 200 substances issues de ces entreprises seront en phase finale d'essais cliniques. Les grands groupes pharmaceutiques auront tout

intérêt à coopérer avec de petites entreprises innovantes et à sous-traiter de plus en plus de travaux de recherche et de développement aux petites et moyennes entreprises de génie génétique.

En 1996, leur nombre a augmenté de 60 pour cent en Europe, pour atteindre 716. Simultanément, l'industrie pharmaceutique poursuit sa restructuration : fusions et absorptions de sociétés augmentent la concentration.

La production des protéines

Le génie génétique se développe depuis la découverte des enzymes de restriction, au début des années 1970. Ces ciseaux moléculaires coupent l'ADN en des séquences spécifiques, de sorte que l'on peut ensuite assembler divers fragments et construire de nouvelles combinaisons. Le premier ADN recombiné a été produit en 1973.

Le langage des gènes étant universel, on peut introduire du matériel génétique étranger dans des cellules ou dans des bactéries, ces dernières synthétisant alors la protéine codée par le gène inséré, comme s'il s'agissait d'un de leurs propres gènes (à condition que le gène introduit dispose des éléments de contrôle appropriés).

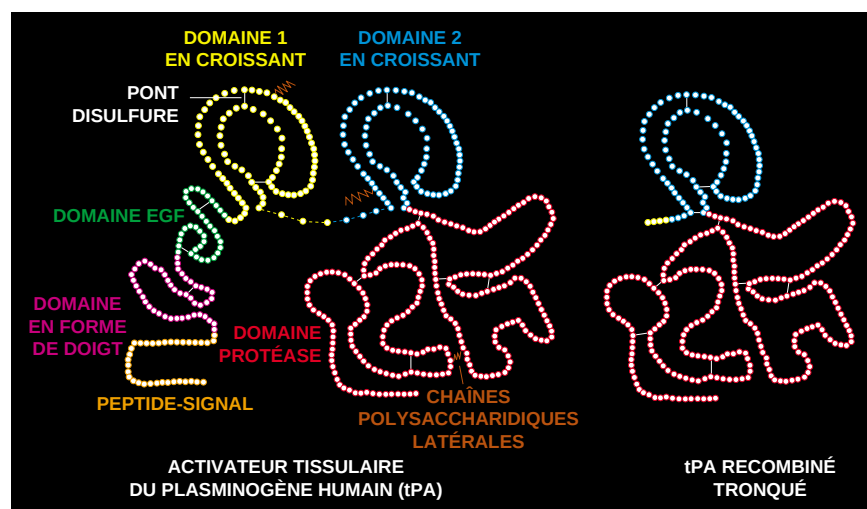
On favorise alors la multiplication des bactéries modifiées dans des fermenteurs où règnent des conditions optimales de culture. Quand la température, l'apport en oxygène et en éléments nutritifs sont appropriés, chaque cellule se divise toutes les 20 minutes, donnant un milliard de cellules en une demi-journée. Les bactéries peuvent contenir jusqu'à la moitié de leur propre poids en protéine étrangère.

Toutefois, de nombreuses protéines humaines ne sont actives qu'après avoir subi des modifications que les bactéries ne réalisent pas. La machinerie biochimique qui assure la maturation des protéines (la mise en forme qui les rend efficaces) diffère entre les bactéries et les cellules humaines. Ainsi, certaines glycoprotéines ne sont correctement produites que dans des cellules animales ou humaines en culture. Pour obtenir l'érythropoïétine, par exemple (voir l'encadré pages 76 et 77), on doit cultiver des cellules d'ovaires de hamster chinois. Les lignées de cellules utilisées sont stables, cultivées pendant des décennies (en

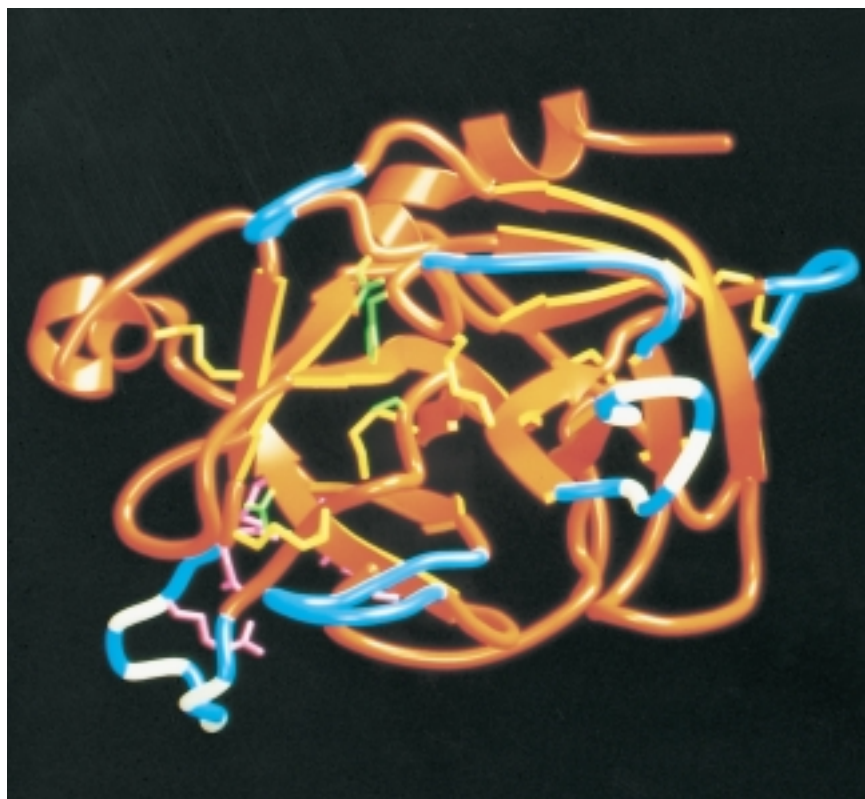
raison de mutations, elles se divisent indéfiniment).

Les cellules en suspension sont cultivées dans des cuves en acier inoxydable de plus de 1 000 litres. Le procédé ressemble au brassage de la bière, où

l'on cultive des levures de bière en présence d'une solution de sucre de malt. Toutefois, les cellules de hamster exigent beaucoup de substances nutritives : des acides aminés, des sucres, des vitamines et diverses hormones de



Tim Harris/Spektrum der Wissenschaft



Wolfgang Bode et Martin Renatus

1. LE tPA RECOMBINÉ (ci-dessus et en haut à droite) est une protéine thérapeutique produite par génie génétique. Elle est utilisée pour la dissolution des caillots sanguins après un infarctus du myocarde. Elle est issue de l'activateur tissulaire du plasminogène humain (tPA) (en haut, à gauche). Cette molécule contient des domaines inutiles, voire indésirables. La souche bactérienne utilisée pour la production du tPA recombiné tronqué ne contient qu'un seul gène tPA, où les séquences d'ADN correspondant à ces domaines inutiles ont été supprimées. La protéine étant synthétisée par des bactéries, elle est dépourvue des chaînes polysaccharidiques latérales qui lui sont normalement ajoutées après sa synthèse ; ici, cette absence est plutôt favorable. Sur le modèle informatique, les acides aminés conférant l'activité catalytique sont en vert et ceux qui forment des ponts disulfure en jaune.

croissance. De surcroît, elles se divisent beaucoup plus lentement que les bactéries (une fois par 24 heures), de sorte qu'il faut une semaine pour produire un nombre suffisant de cellules. Les cellules de hamster sécrètent l'érythropoïétine dans le milieu de culture ; il reste alors à séparer cette substance des autres constituants du milieu par de fastidieuses étapes de purification.

Avec les bactéries, la récupération des protéines produites est simplifiée, car les souches industrielles fabriquent ces molécules en si grande quantité que leur métabolisme est perturbé ; elles s'en défendent en agglomérant les protéines en amas insolubles. Lorsque les bactéries en ont accumulé une quantité suffisante, on récolte ces micro-organismes par fil-

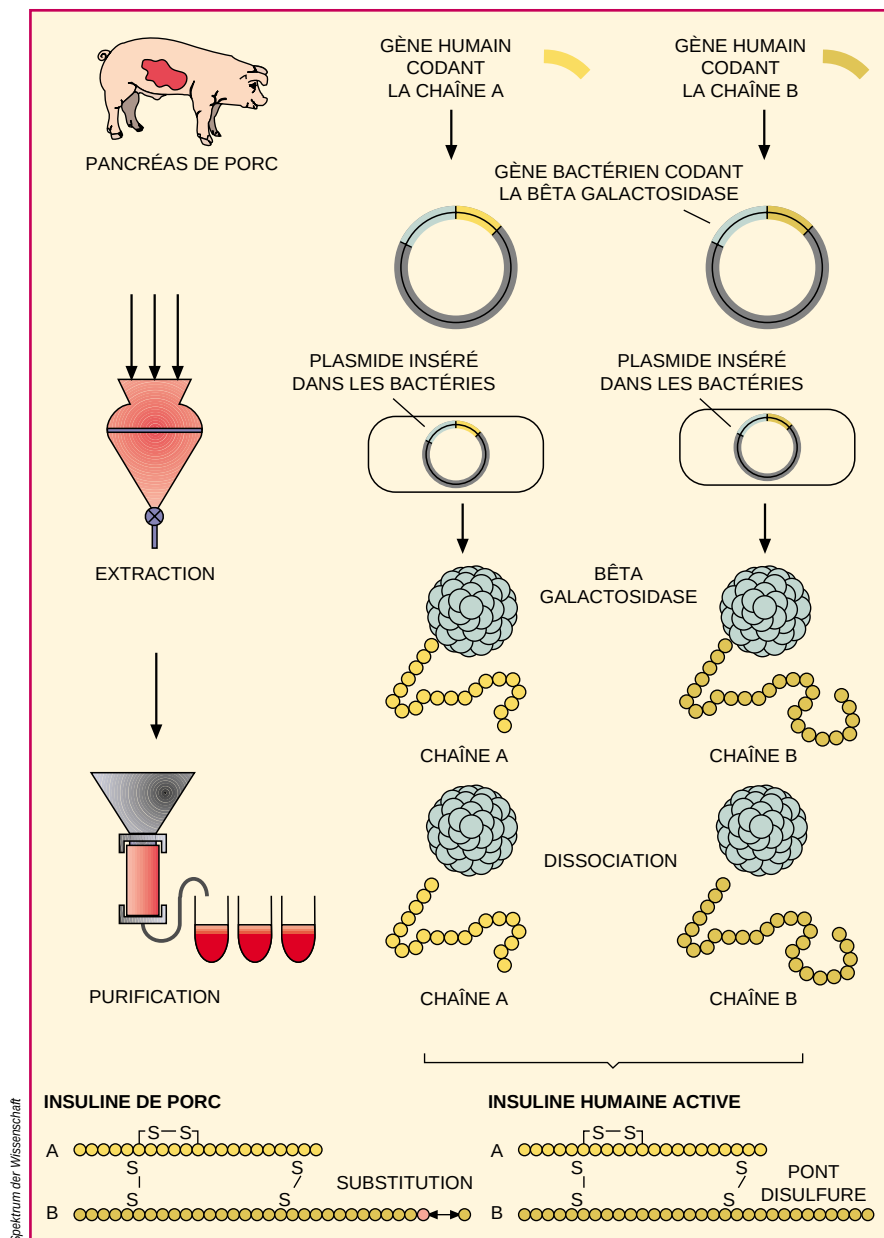
tration, on les dissocie et on récupère les protéines libérées dans la solution. La solubilisation des protéines agglomérées est réalisée à l'aide de quantités massives de chlorure de guanidinium, un sel qui dissocie et déplie les chaînes d'acides aminés ; en réduisant lentement sa concentration, on permet aux chaînes d'acides aminés d'adopter leur structure tridimensionnelle naturelle. Cette renaturation des protéines est longue et son rendement varie selon les protéines. Le procédé est coûteux et nécessite des conditions d'asepsie rigoureuses : une seule bactérie étrangère risquerait de contaminer toute la culture.

Des médicaments produits à la ferme

Les plantes et les animaux transgéniques sont une autre source de protéines thérapeutiques. Pour obtenir de tels organismes, on introduit des gènes humains dans des embryons femelles de chèvres, de porcs, de moutons ou de vaches, après les avoir couplés à un «commutateur génétique», afin que la protéine recherchée soit uniquement produite par les cellules mammaires et sécrétée dans le lait.

L'antitrypsine alpha, obtenue dans le lait de brebis, a été l'un des premiers exemples de ces médicaments «produits à la ferme» ; cette enzyme facilite la respiration des patients souffrant d'une forme d'emphysème pulmonaire. L'antitrypsine alpha extraite du sang de donneurs ne couvrait, jusqu'à présent, qu'un tiers des besoins et coûtait plus de 138 000 francs par patient. Un troupeau de 500 à 1 000 brebis transgéniques, qui produiraient chacune près de 30 grammes d'antitrypsine alpha par litre de lait, satisferait la demande mondiale.

Toutefois, les animaux transgéniques sont difficiles à obtenir par la technique classique de micro-injection de gènes dans les embryons. Par cette méthode, on injecte le gène thérapeutique dans un embryon au stade d'une cellule : ce gène ne s'insère pas nécessairement dans le génome, de sorte que toutes les cellules filles de la première cellule modifiée n'ont pas le gène intéressant. On obtient des animaux mosaïques, dont seules certaines cellules expriment le gène thérapeutique. La micro-injection de gènes dans un embryon est une méthode dont le ren-



2. EXTRACTION DE L'INSULINE de porc (à gauche) et production de l'hormone par génie génétique dans des bactéries (au centre et à droite). L'insuline de porc extraite du pancréas d'animaux d'abattoir ne diffère que par un seul acide aminé de l'hormone humaine ; une substitution catalysée par une enzyme la transforme en insuline humaine, mais la production est insuffisante. L'insuline humaine produite par génie génétique couvrira les besoins mondiaux toujours croissants, indépendamment de l'approvisionnement en insuline de porc. Dans cette méthode, les séquences codant les deux chaînes de l'insuline sont insérées à la suite du gène bactérien codant l'enzyme bêta galactosidase (à droite). Les bactéries transformées synthétisent l'enzyme prolongée de la chaîne A ou B d'insuline. On dissocie ensuite ces chaînes de la bêta galactosidase, on les purifie et on les rassemble.

dement est faible et le coût élevé, et qui donne des animaux mosaïques. Pour éviter ces inconvénients, on peut utiliser les techniques de clonage. Les biologistes cherchent à introduire le gène thérapeutique dans des cellules fœtales de plusieurs jours et sélectionnent celles qui l'ont effectivement intégré. Le noyau contenant le gène est alors introduit dans un ovocyte dont on a retiré le noyau : cette cellule modifiée – un embryon – est réimplantée dans une mère porteuse. Lorsque l'on a obtenu un animal transgénique intéressant, on peut à nouveau utiliser les méthodes de clonage pour le multiplier plus rapidement qu'en attendant l'accomplissement du cycle normal de la reproduction.

Une autre solution serait l'utilisation de plantes. En effet, le code génétique étant universel, la frontière entre le monde animal et le monde végétal est ténue. En collaboration avec la Société *Limagrain-Biosanté*, Claude Poyart, Michael Marden et leurs collègues de l'Unité INSERM U299, à l'Hôpital Bicêtre, ont réussi à introduire le gène de l'hémoglobine dans un plant de tabac. La plante a synthétisé les deux sous-unités de la molécule d'hémoglobine (la globine alpha et la globine bêta), qui se sont associées au groupe hème de la plante (cette structure chimique est la même dans le règne végétal et dans le règne animal). La molécule obtenue semble fonctionnelle, puisqu'elle fixe l'oxygène (c'est le transporteur naturel de l'oxygène dans le sang) et le monoxyde de carbone (ce gaz a une forte affinité pour l'hémoglobine et, quand il est inhalé, il se fixe sur l'hémoglobine qui ne transporte plus l'oxygène, ce qui entraîne la mort par asphyxie).

Toutefois la quantité d'hémoglobine synthétisée est infime, et la protéine n'est exprimée que dans les graines et dans les racines. Les biologistes recherchent d'autres plantes qui pourraient assurer cette synthèse avec de meilleurs rendements. Des études sont notamment en cours sur le maïs (les méthodes de récupération des protéines extraites des graines de maïs sont bien maîtrisées). La production à grande échelle d'une enzyme digestive est en cours de développement.

Deux sociétés américaines font, d'ores et déjà, produire à du maïs et à du soja, des vaccins, des anticorps monoclonaux et diverses protéines thérapeutiques. Aucune de ces molécules



Victor Colombo et François Gerber

3. LES PROTÉINES ÉTRANGÈRES synthétisées par des bactéries sont souvent stockées sous forme d'inclusions insolubles. Ces amas de protéines apparaissent sous forme de masses sombres sur cette photographie prise au microscope électronique ; elles représentent parfois jusqu'à la moitié du poids de la bactérie productrice. On isole ces protéines après avoir fait éclater les bactéries. Ensuite, on les déroule en ajoutant des sels dont on diminue progressivement la concentration, de façon à ce que les protéines adoptent leur conformation naturelle, biologiquement active.

produites par les plantes n'est encore commercialisée.

Quelles protéines fabriquer par génie génétique ? Au cours d'une évolution qui a duré des millions d'années, les protéines les mieux adaptées à chaque tâche biochimique ont été sélectionnées. Inversement, les modifications qui nuisaient à l'organisme ont été éliminées. C'est pourquoi on n'a pas non plus à craindre d'imprévisibles effets secondaires – toxiques, cancérogènes ou tératogènes – lorsque l'on apporte à l'organisme une protéine qu'il ne synthétise pas ou qu'il produit en quantité insuffisante. Le génie génétique produit des protéines dont la séquence en acides aminés est identique à celle des protéines naturelles.

Recopier la nature

L'érythropoïétine est une de ces protéines identiques aux protéines naturelles que l'on a appris à produire. Chez l'adulte, l'érythropoïétine synthétisée par le rein déclenche la différenciation en globules rouges des précurseurs des cellules sanguines présents dans la moelle osseuse. Les personnes qui ont une maladie rénale chronique ne fabriquent généralement plus cette hormone en quantité suffisante. Les dialyses épuisent le sang, opération normalement

assurée par les reins, mais elles ne compensent pas le manque d'érythropoïétine. Sans l'hormone, les globules rouges se raréfient, de sorte que les tissus sont mal oxygénés et que les personnes atteintes sont très fatiguées. Des transfusions sanguines régulières les soulagent, mais elles risquent de transmettre des agents pathogènes et de surcharger l'organisme en fer, dommageable pour le foie et pour le cœur.

En revanche, chez les patients à qui l'on administre de l'érythropoïétine recombinée, le nombre de globules rouges augmente rapidement, et leur état général s'améliore. Près de 30 à 50 pour cent des quelque 300 000 dialysés dans le monde sont traités avec l'érythropoïétine recombinée. Cet exemple montre que l'on peut traiter avec des protéines recombinées non seulement des maladies héréditaires, telle l'hémophilie, mais aussi des maladies acquises.

À côté de ces protéines identiques aux protéines naturelles, les biologistes espèrent bientôt produire des protéines thérapeutiques sur mesure. Ils ont appris à assembler différents gènes ou parties de gènes ; la molécule codée est une protéine de fusion (ou protéine hybride). On utilise cette technique pour combiner des anticorps monoclonaux, ou leurs sites de reconnais-

sance, et une protéine. Ces chimères moléculaires devraient avoir une action anticancéreuse ciblée : un anticorps qui reconnaîtrait des cellules tumorales s'y ancrerait et permettrait à la substance active accolée (par exemple une toxine bactérienne) d'agir sur ces cellules cibles.

La fusion génétique autorise aussi la synthèse d'anticorps « bispécifiques » : si leurs deux bras reconnaissent deux cibles différentes, les molécules pourraient rapprocher d'une cellule tueuse du système immunitaire une cellule tumorale et provoquer la destruction de cette dernière.

Toutefois, on ne connaît encore aucune molécule capable de reconnaître spécifiquement des cellules tumorales, de sorte que ces médicaments testés n'ont pas une action aussi ciblée ni sûre qu'on le souhaiterait. En outre, les toxines bactériennes utilisées déclenchent généralement des réactions de défense, qui finissent par rendre les molécules chimères inefficaces.

Afin d'adapter une protéine aux exigences thérapeutiques, on peut aussi éliminer certaines parties du gène qui la code. Cette stratégie a été utilisée par la Société *Boehringer Mannheim* pour la production du tPA recombiné tronqué, utilisé contre l'infarctus du myocarde. On sait que les infarctus surviennent quand un caillot sanguin obstrue une artère coronaire : le caillot, constitué d'un réseau de fibrine et de plaquettes sanguines, doit être éliminé aussi vite que possible, car un tissu non irrigué se nécrose.

Pour dégager les vaisseaux, on utilisait des enzymes telles que la streptokinase bactérienne et, depuis une dizaine d'années, la protéine humaine tPA (de l'anglais *tissue Plasminogen Activator*, soit « activateur tissulaire du plasminogène ») ; les deux substances transforment le plasminogène en plasmine, une enzyme naturelle qui dégrade les fibres de fibrine.

Comme le foie élimine rapidement le tPA naturel du sang, on doit en administrer des doses élevées, afin qu'il ait le temps d'agir. Toutefois, une concentration élevée risque d'entraîner des hémorragies internes, des lésions cérébrales avec paralysies, voire la mort. Le tPA entier a également l'inconvénient de se fixer à la surface du caillot de fibrine, ce qui l'empêche de pénétrer dans le caillot pour le dissoudre.

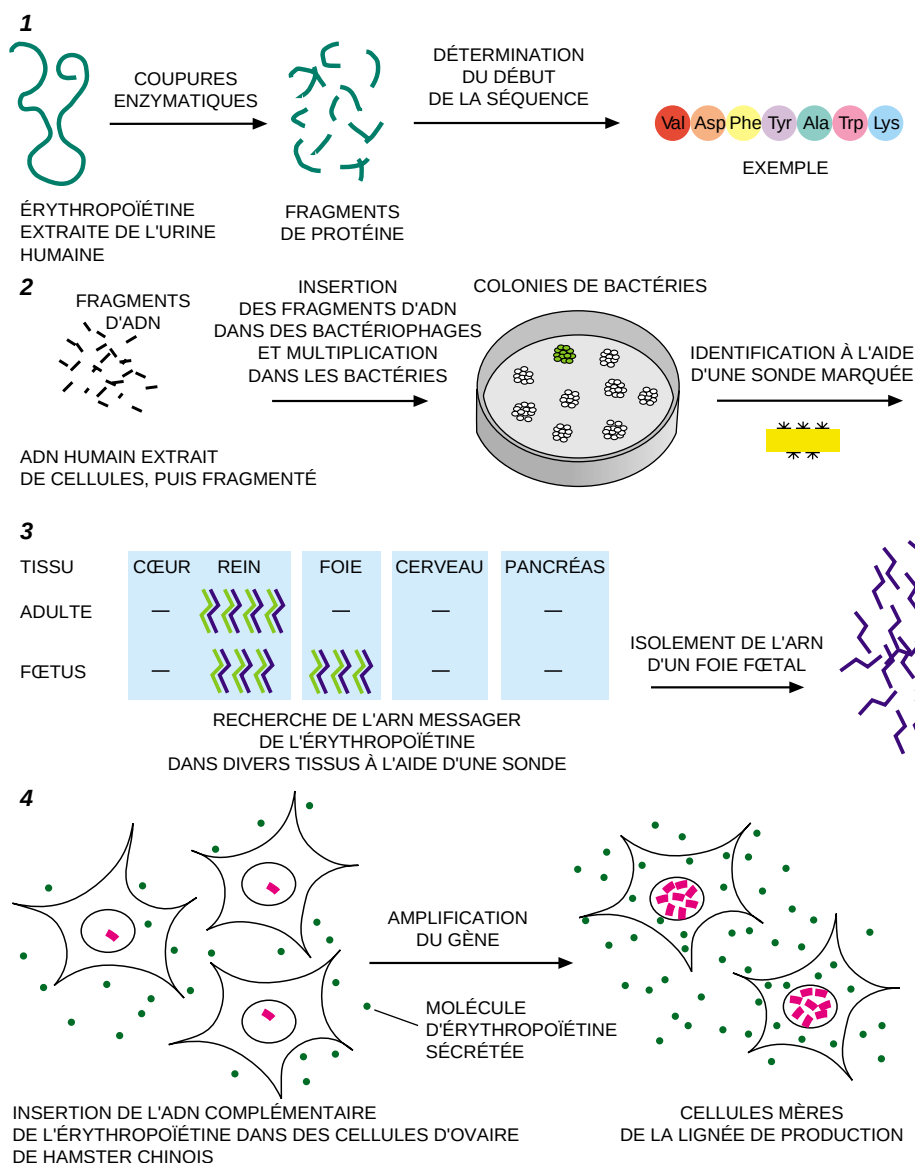
Or, le tPA est constitué de plusieurs domaines, chacun assurant une fonc-

tion donnée. Par génie génétique, on sait sélectionner les domaines en éliminant du gène les séquences qui codent les propriétés gênantes. Afin d'améliorer la protéine thérapeutique, on ne fait produire par des bactéries que deux domaines génétiques, qui codent les deux derniers des cinq domaines que compte normalement la molécule. Comme chaque

domaine adopte sa conformation spatiale quasi indépendamment des autres, la molécule à deux domaines (le tPA recombiné tronqué) se replie normalement. Sa demi-vie dans l'organisme est trois fois supérieure à celle de la molécule naturelle, et sa fixation à la surface des caillots est moins forte, de sorte qu'elle y pénètre mieux et les dissout

Préparation d'une lignée cellulaire

L'érythropoïétine est une hormone que l'on fait produire par des cellules de mammifères transformées par génie génétique, car ces dernières synthétisent la protéine dans sa conformation biologiquement active et l'excrètent dans le milieu de culture. Quand on ignorait la séquence du gène qui code cette hormone, on a d'abord isolé la protéine de l'urine humaine, déterminé sa séquence en acides aminés et déduit la séquence probable de l'ADN correspondant (étape 1). On a ensuite synthétisé un court fragment de cet ADN marqué pour « pêcher » dans une banque de gènes un fragment d'ADN humain naturel contenant une séquence codant l'érythropoïétine (étape 2). La banque de gènes est consti-



plus rapidement. Comme le tPA recombiné tronqué reste plus longtemps dans le sang, il peut être injecté, et ne nécessite pas une perfusion continue, ce qui est le cas du tPA entier.

À l'heure où la plupart des pays cherchent à maîtriser leurs dépenses de santé, les nombreux succès thérapeutiques obtenus avec des protéines

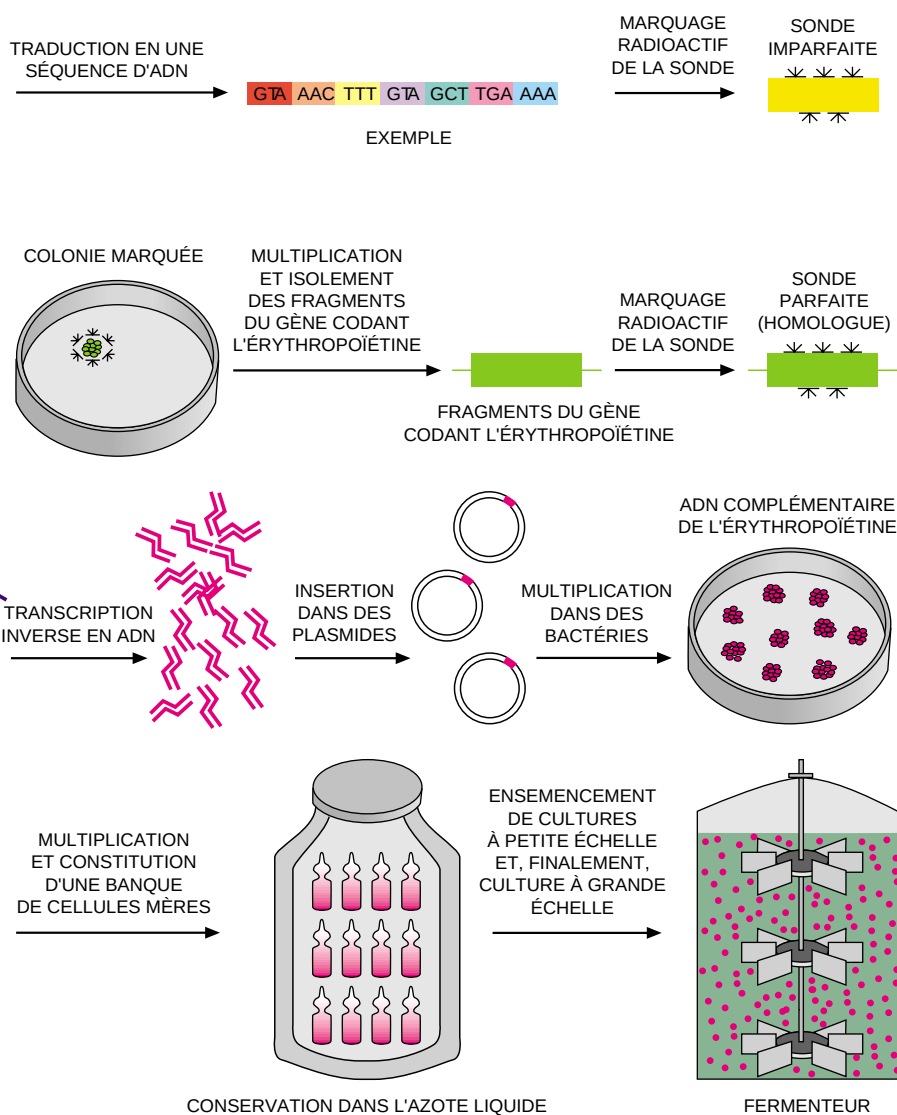
recombinées justifient leur prix de revient élevé par rapport à celui des médicaments classiques : la culture industrielle de cellules de mammifères est onéreuse, et les protéines recombinées sont souvent administrées à des doses élevées, ce qui augmente d'autant le prix du traitement. Toutefois, les médicaments coûtent de plus en

plus cher, en raison de l'allongement de la durée de leur mise au point, qui, en 30 ans environ, a quintuplé : généralement, plus de dix années s'écoulent avant la mise sur le marché d'un médicament.

De surcroît, une nouvelle molécule chimique n'a guère qu'une chance sur dix de passer avec succès toutes les étapes de sélection qui vont des premiers essais cliniques à la mise sur le marché. Au contraire, la durée moyenne de mise au point des médicaments recombinés autorisés jusqu'à présent a été plus courte, et près d'une molécule sur deux a été commercialisée : les protéines recombinées sont moins toxiques que d'autres molécules, ce qui explique peut-être leur succès. Une fois que l'on connaît le mécanisme d'action d'une protéine, sa production est moins aléatoire que celle d'une substance de synthèse.

pour la production de l'érythropoïétine

tuée de fragments de gènes humains insérés dans des virus infectant les bactéries (des bactériophages). Le fragment codant l'érythropoïétine a ensuite servi de sonde pour repérer les cellules de l'organisme qui produisent l'ARN messager de l'érythropoïétine en grande quantité (étape 3). Ces ARN, qui contiennent le programme complet des informations nécessaires à la synthèse de l'hormone, ont été retranscrits en ADN à l'aide d'une enzyme, clonés dans des bactéries et transférés dans des cellules d'ovaires de hamster. Le gène a été amplifié (étape 4). À partir de la banque des cellules mères, on réalise d'abord des cultures de taille limitée, puis on les utilise à grande échelle dans des fermenteurs.



Du laboratoire à la pharmacie

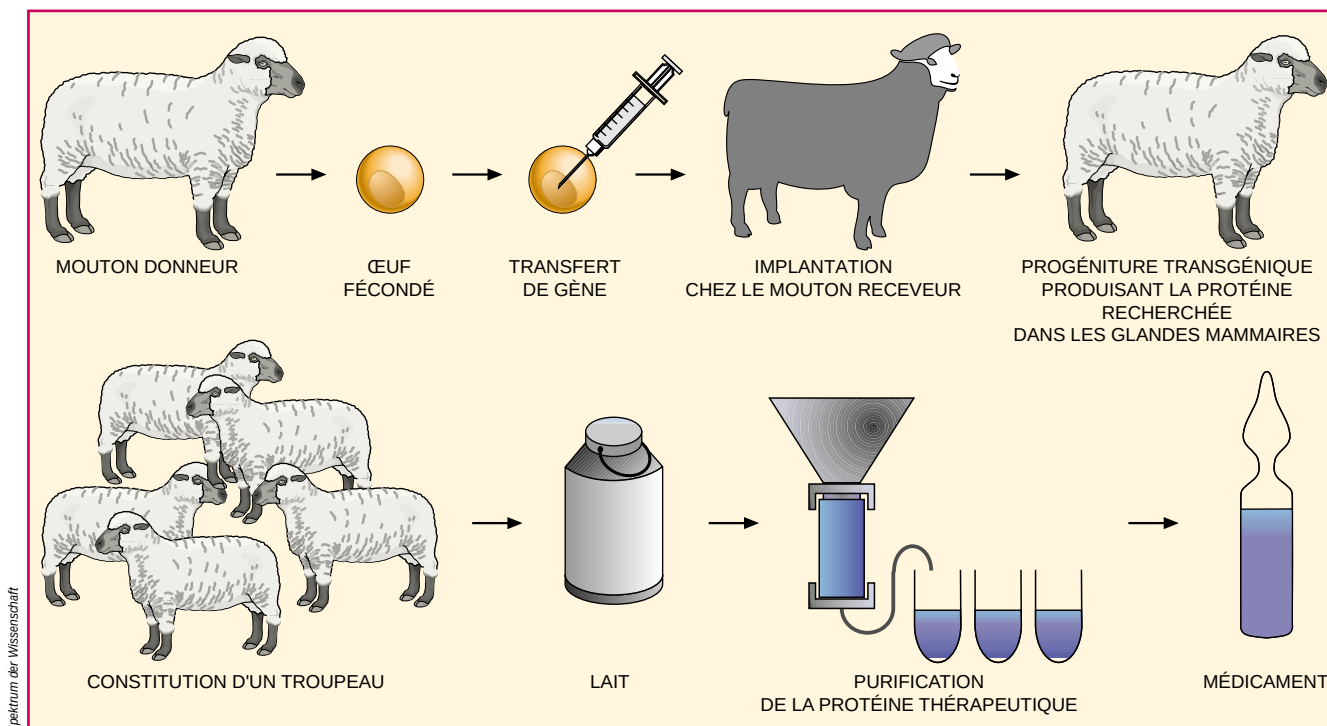
Les protéines thérapeutiques du futur seront produites, non pas dans des fermenteurs, mais directement dans l'organisme du patient. Ces médicaments ne seront plus constitués du principe actif lui-même, mais du gène qui en assure la synthèse. À l'aide de vecteurs, l'ADN pénétrera dans les cellules de l'organisme, qui produiront alors la protéine requise. Aujourd'hui, deux vecteurs sont à l'étude : des virus modifiés, notamment des adénovirus et des rétrovirus, et diverses enveloppes lipidiques (des molécules de graisse), nommées liposomes.

Pour la première fois, on pourra lutter contre les maladies héréditaires, c'est-à-dire traiter leur cause et non pas seulement les symptômes. On traitera par la thérapie génique les cellules somatiques (toutes les cellules, à l'exception des cellules de la reproduction), de sorte qu'elles pallieront elles-mêmes leur déficit. De nombreux obstacles demeurent, mais cette voie permettra d'élargir l'éventail des traitements par des protéines recombinées. Ainsi, on compensera par un apport externe l'absence ou l'inefficacité de substances qui, à l'instar des hormones, des facteurs de croissance ou d'autres messagers, sont présentes dans le sang ou dans les tissus. En revanche, s'il manque une protéine au sein des cellules, un apport externe ne compensera pas le déficit.

C'est précisément la difficulté posée par la mucoviscidose, une maladie héréditaire qui atteint un nouveau-né sur 2 000 environ. Elle se caractérise par une sécrétion de mucus anormalement visqueux dans les voies respi-

ratoires et dans le système gastro-intestinal, entraînant une détérioration progressive des organes atteints ; des complications pulmonaires surviennent rapidement. Cette maladie apparaît quand les deux exemplaires du

gène codant une protéine (un canal chlore membranaire) sont anormales. Quelques essais thérapeutiques visent à insérer le gène normal dans les cellules de l'épithélium pulmonaire : les personnes atteintes doivent inhaler un



4. LES ANIMAUX TRANSGÉNIQUES produisent des protéines recombinées. On a introduit dans leur génome un gène qui code une protéine humaine, couplé à une séquence régulatrice, qui n'est activée que dans les cellules mammaires. La protéine recherchée

est extraite du lait. Dans le cas de l'enzyme antitrypsine alpha, on a inséré le gène humain dans des embryons de moutons. Jusqu'à présent, cette protéine n'était extraite que du sang et ne couvrait que le tiers des besoins mondiaux.

Les cellules utilisées pour la production de médicaments par génie génétique

Le choix d'un organisme de production doit tenir compte non seulement de critères économiques, mais aussi des procédures d'autorisation de mise sur le marché imposées par les services sanitaires européens et américains. Trois organismes génétiquement modifiés servent surtout à la production de protéines thérapeutiques : la bactérie *Escherichia coli*, la levure

Saccharomyces cerevisiae et les cellules d'ovaire de hamster chinois. Les lignées cellulaires, établies depuis plusieurs années, sont bien caractérisées ; en outre, on dispose de diverses méthodes de génie génétique pour les modifier. La protéine exprimée est soit excrétée dans le milieu de culture, soit stockée dans les micro-organismes modifiés.

	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
<i>Escherichia coli</i>	Reproduction rapide, fermentation accélérée, culture relativement simple ; matières premières peu coûteuses ; diverses souches disponibles.	Protéines recombinées, souvent stockées sous forme d'inclusions insolubles. Les protéines n'ont pas toujours leur conformation biologiquement active.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levure)	Croissance rapide et culture assez facile ; pas de formation d'inclusions ; modifications des protéines recombinées possibles.	La conformation n'est pas toujours correcte ; les protéines peuvent déclencher des réactions de défense.
Cellules d'ovaire de hamster chinois	Divers systèmes de transfert de gènes ont été mis au point ; possibilité d'amplification du gène inséré ; conformation quasi normale.	Culture laborieuse et coûteuse ; rendements relativement faibles (par comparaison avec <i>Escherichia coli</i> ou avec la levure).

aérosol contenant le gène normal véhiculé par un vecteur. On espère que le gène s'intégrera dans le génome des cellules pulmonaires, qui produiront alors le canal chlore normal, corrigeant ainsi l'anomalie.

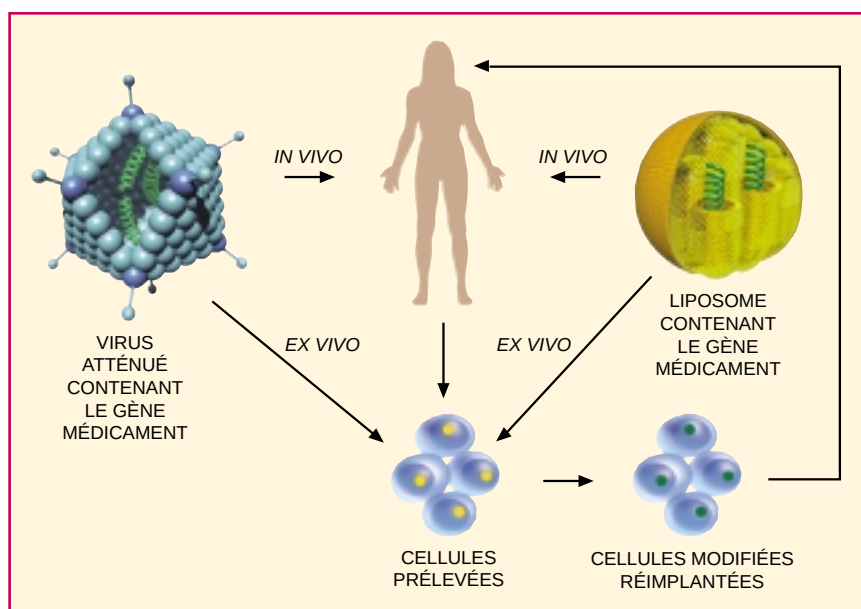
On réalise aussi des transferts de gènes non pas directement dans l'organisme, mais plutôt dans des cellules prélevées au malade et réintroduites après avoir été modifiées. Ainsi, pour insérer du matériel génétique dans des cellules sanguines, on cultive des précurseurs de ces cellules hors de l'organisme et on y introduit le gène normal. Toutes les cellules sanguines qui seront issues des cellules souches modifiées porteront le nouveau gène intact.

Le premier essai de thérapie génique fondé sur ce principe a eu lieu en 1990, chez une petite fille qui ne synthétisait pas d'adénosine désaminase : cette maladie génétique entraîne un grave déficit immunitaire, car les métabolites toxiques s'accumulent dans les cellules et endommagent notamment les précurseurs des globules blancs. Une trentaine de personnes dans le monde sont atteintes de cette maladie.

Toutefois, plus de la moitié des essais cliniques de thérapie génique en cours visent à traiter le cancer, qui résulte d'anomalies génétiques héréditaires combinées à des anomalies acquises au cours de la vie. Le cancer est la deuxième cause de mortalité dans les pays occidentaux.

On essaie de renforcer les défenses de l'organisme contre les cellules cancéreuses. On peut, par exemple, vacciner le malade avec ses propres cellules tumorales génétiquement manipulées : elles produisent alors des substances qui, telle l'interleukine 2, renforcent l'activation des cellules immunitaires contre la tumeur. Si les premiers essais avaient été encourageants chez la souris, ceux qui ont été tentés sur l'homme n'ont pas été concluants.

Dans d'autres cas, on tente de rendre les cellules tumorales sensibles à un médicament. C'est le cas du glioblastome, la forme la plus répandue de tumeur cérébrale ; on introduit dans les cellules tumorales le gène du virus de l'herpès qui code la thymidine kinase. Les cellules tumorales qui ont incorporé ce gène deviennent sensibles à un médicament antiviral, le Ganciclovir. Les résultats partiels des essais cliniques sont encourageants.



5. LES PROTÉINES THÉRAPEUTIQUES DU FUTUR seront directement produites dans l'organisme du malade. On n'administrera plus la substance active, on insérera dans les cellules le gène codant cette substance. Le gène est inséré soit directement dans l'organisme (*in vivo*), soit dans des cellules préalablement prélevées sur la personne à traiter, transformées en laboratoire et réinjectées (*ex vivo*). Les gènes seront transférés par des vecteurs, vraisemblablement des virus atténués ou des liposomes (des enveloppes formées de lipides) (*en vert*).

Les exemples cités n'illustrent qu'une partie des potentialités de la thérapie génique, qui améliorera la lutte ciblée contre le cancer et contre d'autres maladies jusqu'ici incurables.

Perspectives industrielles

L'Allemagne commercialise beaucoup de médicaments produits par génie génétique. Toutefois, sur les 32 substances actives autorisées, six seulement y sont fabriquées, parce que les procédures de demande de mise sur le marché ont longtemps été fastidieuses et que le public se méfiait du génie génétique ; de nombreux laboratoires se sont implantés à l'étranger (75 pour cent des investissements des laboratoires pharmaceutiques allemands utilisant les biotechnologies ont été faits à l'étranger). Aujourd'hui pourtant, les autorisations sont obtenues plus rapi-

dement, et les procédures ont été allégées ; de surcroît, le public accepte mieux que l'on produise par génie génétique des médicaments destinés à soulager les souffrances humaines. En 1996, 253 nouveaux médicaments issus des biotechnologies étaient en phase d'essais cliniques dans le monde, et d'autres substances sont en cours de développement.

Ainsi, la médecine du futur reposera toujours plus sur la connaissance de nos gènes. D'ici l'an 2005, au plus tard, l'ensemble du génome humain devrait être séquencé. Le Programme génome humain est le projet mondial le plus ambitieux jamais entrepris dans le domaine biomédical (il coûtera quelque 20 milliards de francs). La recherche des gènes responsables des maladies est bien engagée. Il appartiendra à l'homme de faire bon usage de ces nouvelles connaissances.

Gabor STIEGLER est journaliste scientifique. Georg-Burkhard KRESSE est professeur de biochimie à l'Université Ludwig-Maximilian de Munich et dirige le département recherche et développement en biotechnologies de la Société *Boehringer Mannheim*, à Penzberg. Peter BUCKEL, professeur à l'Université de Munich, travaille aussi dans la Société *Boehringer Mannheim*.

Felix FRANKS, *Protein Biotechnology*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993.

B.R. GLICK et J.J. PASTERNAK, *Molecular Biotechnology*, American Society for Microbiology, 1994.

William VELANDER, Henryk LUBON et William DROHAN, *Des animaux transgéniques produisent des médicaments*, in *Pour la Science*, mars 1997.

Thérapie génique et système nerveux

DORA HO • ROBERT SAPOLSKY

En introduisant des gènes dans les cellules du cerveau, les médecins cherchent à ralentir les dégénérescences cérébrales et à supprimer les lésions.

Les maladies neurologiques sont parmi les maladies chroniques les plus redoutées : la maladie de Parkinson ou la sclérose latérale amyotrophique privent progressivement le malade du contrôle de son organisme. De même, une lésion de la moelle épinière peut, en un instant, créer une atteinte irréparable. Quant à la maladie d'Alzheimer, qui touche 20 pour cent des personnes âgées de plus de 85 ans, elle détruit les capacités cérébrales.

La lutte contre ces maladies a peu progressé, principalement parce que le cerveau et la moelle épinière sont très vulnérables. Contrairement à de nombreux types de cellules, les cellules nerveuses, ou neurones, ne se divisent plus chez les adultes. C'est là l'origine du drame que constitue toute maladie ou lésion neurologique : les neurones qui sont touchés sont perdus, et aucune lésion du tissu nerveux cérébral ou médullaire ne se régénère spontanément.

Ce sombre tableau pourrait s'éclaircir. Des biologistes cherchent à remplacer les cellules perdues d'un tissu endommagé par transplantation de neurones ou par administration de facteurs de croissance : d'une part, ces composés stimulent les neurones survivants, de sorte qu'ils accroissent leur champ d'action et, d'autre part, ils redonnent aux cellules dormantes la capacité de se régénérer. Ces thérapies, très ambitieuses, ne seront probablement pas courantes avant de nombreuses années. À plus court terme, on souhaite empêcher la mort des neurones.

Ces dernières années, les neurobiologistes ont mieux compris com-

ment les neurones meurent à la suite d'accidents vasculaires cérébraux, de crises d'épilepsie, de lésions cérébrales, ou en raison de maladies évolutives telles que celles de Parkinson et d'Alzheimer. Les quelques essais menés pour tirer parti de ces découvertes montrent que certains médicaments protègent les neurones menacés, et qu'on parvient même, en refroidissant le cerveau, à prévenir la mort de cellules fragiles lors de crises neurologiques. En outre, l'étude de la dégénérescence des neurones, au cours des maladies, laisse entrevoir comment on pourrait protéger ces cellules en modifiant leurs gènes.

Reprogrammer pour survivre

Les gènes fournissent aux cellules des instructions pour fabriquer des protéines spécifiques, telles les enzymes qui catalysent des réactions biochimiques. Par exemple, les cellules nerveuses produisent des enzymes qui synthétisent des neuromédiateurs, substances qui assurent la communication entre neurones dans les zones où ceux-ci sont en contact (les synapses). Pour éviter la mort de ces cellules, on imagine de leur donner un gène qui coderait une protéine capable de les protéger.

Comment faire, en pratique ? La première question est de savoir quelle protéine serait utile. On pourrait augmenter la production d'une protéine cérébrale chez les personnes où cette protéine est anormale ou synthétisée en quantités inadaptées. Cependant, on pourrait aussi faire synthétiser

aux neurones une nouvelle protéine provenant d'un autre type de tissu ou même d'un organisme différent.

La stratégie « antisens » est une autre forme de thérapie génique : on fait entrer, dans le noyau cellulaire, une séquence de nucléotide qui bloque la fabrication d'une protéine spécifique. Une telle thérapeutique, qui limite la synthèse des protéines nuisibles, serait utile dans certaines formes de sclérose latérale amyotrophique ou d'autres maladies neurologiques qui résultent de l'activité destructrice d'une protéine normale ou de l'activité d'une protéine défectueuse, telle la maladie de Huntington. Les stratégies antisens pourraient aussi servir lorsque, pour des raisons encore inexpliquées, les neurones synthétisent des protéines qui déclenchent une violente crise neurologique. Ainsi, de nombreux biologistes cherchent à bloquer la fabrication des protéines dites « de mort », qui poussent les neurones lésés à se détruire.

Quand on comprend le mécanisme d'une maladie neurologique, on peut constituer une liste des gènes qui préserveraient les neurones, mais comment introduire ces gènes dans les neurones ? L'injection directe d'ADN nu dans le tissu cérébral ne conduit pas à l'assimilation de cet ADN par les neurones, alors que cette technique fonctionne avec d'autres cellules. Une meilleure technique consiste à insérer d'abord le gène dans une sphère, nommée liposome, dont la paroi est une double couche de molécules de lipides. En raison de la ressemblance chimique des molécules de lipides et des molécules qui constituent les

membranes cellulaires, ces minuscules conteneurs peuvent transporter l'ADN jusque dans les neurones cibles : ils fusionnent avec la membrane cellulaire et libèrent leur contenu dans le milieu intracellulaire. Les neurones incorporent alors une partie de ce matériel génétique dans leur noyau, là où se trouve leur propre ADN, puis ils utilisent les gènes introduits pour fabriquer la protéine thérapeutique codée par ces gènes.

Les virus sont des vecteurs de gènes encore plus efficaces. Lorsque les virus infectent des cellules, ils y introduisent leur matériel génétique : les gènes viraux commandent ensuite la synthèse des diverses molécules nécessaires à la fabrication de nouveaux virus. Bien que les virus naturels aient un redoutable pouvoir destructeur, les biologistes savent les transformer en de simples navettes inoffensives, qui se limitent à véhiculer des gènes thérapeutiques à l'intérieur des cellules. Afin d'effectuer une thérapie génique du système nerveux central, les biologistes concentrent leurs efforts sur quelques types de virus, dont les adénovirus et les virus de l'herpès.

Sur l'animal, les expériences menées avec ces virus ont confirmé la faisabilité de la thérapie génique du système nerveux. La recherche est particulièrement active en ce qui concerne la maladie de Parkinson, dont les ravages résultent de la dégénérescence

progressive d'une partie du cerveau, nommée substance noire. La destruction de cette région, qui commande en partie la motricité, perturbe la coordination du mouvement et provoque un tremblement caractéristique.

Le combat contre la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson survient à la mort des neurones de la substance noire qui sécrètent un neuromédiateur, la dopamine. Tous les dix ans, les adultes perdent quatre pour cent de ces neurones «dopaminergiques», mais la maladie de Parkinson résulte d'un mécanisme pathologique qui accélère la mort des neurones. Les symptômes apparaissent lorsque 70 pour cent de ces derniers sont détruits.

La cause initiale de cette maladie reste inconnue, mais les symptômes proviennent de l'insuffisance de production de dopamine. Un moyen direct de corriger ce déficit, du moins temporairement, est de stimuler la production de dopamine. En augmentant la production d'une enzyme essentielle à sa synthèse (la tyrosine hydroxylase), on augmente la concentration en dopamine, aussi longtemps que les cellules de la substance noire survivent.

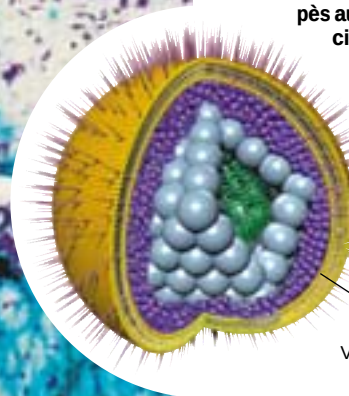
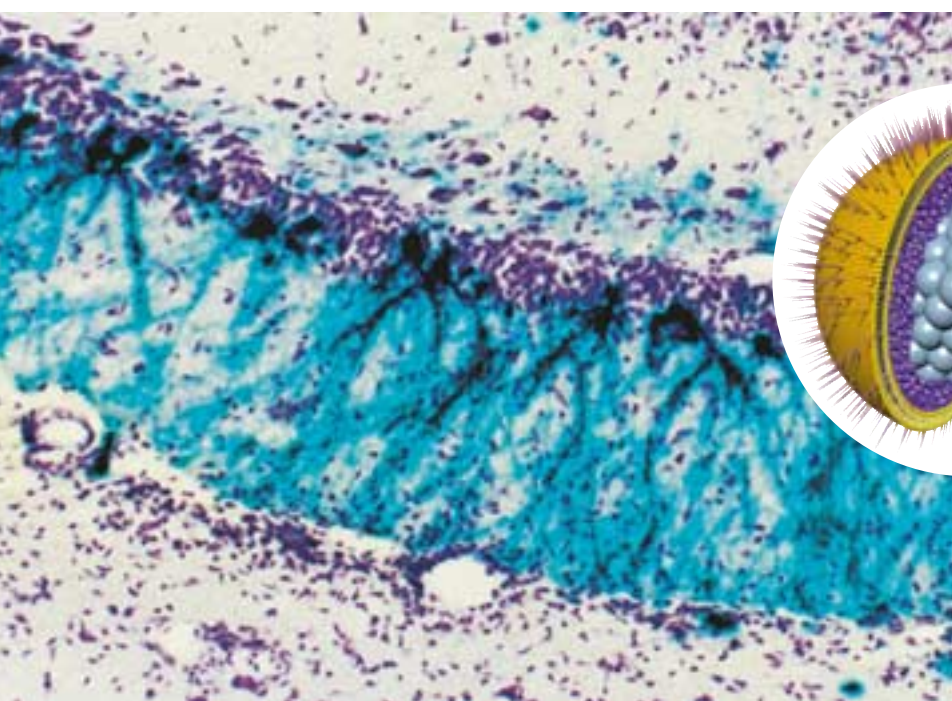
Bien que l'on sache augmenter la concentration cérébrale en dopamine à l'aide d'une substance nommée L-

dopa, ce médicament agit sur d'autres régions cérébrales et provoque parfois des effets secondaires. La thérapie génique agirait uniquement à l'intérieur de la substance noire.

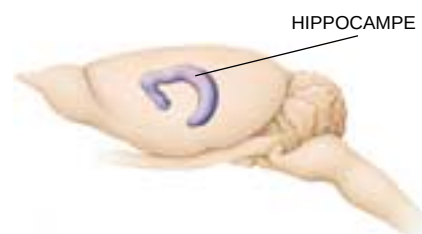
De nombreux biologistes étudient ce traitement. Plusieurs équipes de recherche ont récemment utilisé des virus de l'herpès et des adénovirus comme vecteurs géniques pour corriger les troubles provoqués chez des rats par un traitement chirurgical qui déclenchait des symptômes de la maladie de Parkinson. La mise en œuvre d'une thérapie génique a augmenté la production de l'enzyme correctrice, a accru la quantité de dopamine au voisinage des cellules qui en avaient été privées, et a partiellement éliminé les troubles de motricité des animaux.

Dale Bredesen et ses collègues de l'Institut Burnham, en Californie, ont étudié un traitement encore plus élaboré. Des biologistes avaient montré qu'une transplantation de neurones isolés de la substance noire de fœtus de rats corrigeait certains des symptômes parkinsoniens provoqués chez des rats adultes par voie chirurgicale : les neurones fœtaux libéraient de la dopamine dans la substance noire. Malheureusement, les neurones transplantés finissaient par s'autodétruire. Avant de transplanter les neurones fœtaux, D. Bredesen et ses collègues leur firent subir une thérapie génique :

1. DES NEURONES (en bleu clair sur la microphotographie) prélevés dans l'hippocampe d'un cerveau de rat ont intégré un virus d'herpès auquel on a ajouté un gène. Celui-ci code une protéine qui fait virer les cellules au bleu lorsqu'elles sont convenablement préparées pour une analyse microscopique.



VIRUS D'HERPÈS SIMPLEX



HIPPOCAMPE

Photo : R. Spolsky. Virus : Slim Films. Cerveau de rat : T. Narashima

ils leur ajoutèrent un gène qui code la protéine bcl-2, laquelle bloque le suicide cellulaire. Quatre semaines plus tard, l'état des rats qui avaient reçu les greffons normaux s'était à peine amélioré, tandis que les animaux dont les greffons portaient le gène supplémentaire se portaient mieux. Ce résultat est encourageant, mais le traitement de la maladie de Parkinson nécessitera une survie des greffons pendant plusieurs années. Pour soulager les malades, des médecins ont déjà réalisé des transplantations de cellules fœtales humaines, mais avec des résultats incertains. Des modifications génétiques des cellules fœtales humaines avant leur transplantation donneraient peut-être de meilleurs résultats.

Nouveaux traitements

Les succès déjà obtenus font espérer l'apparition prochaine de nouveaux traitements de la maladie de Parkinson et d'autres maladies résultant de dégénérescences progressives du cerveau. Ainsi la thérapie génique permettrait de limiter les lésions causées

par les troubles neurologiques aigus, telles les crises d'épilepsie.

Lors de ces crises, les cellules cérébrales les plus vulnérables sont les neurones sensibles à un neuromédiateur exciteur, le glutamate. Habituellement, le glutamate commande l'absorption de calcium par les neurones, ce qui modifie durablement l'excitabilité des synapses stimulées par ce neuromédiateur. Ce mécanisme serait le fondement cellulaire de la mémoire.

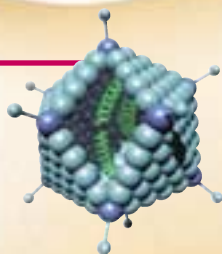
Toutefois, durant une crise d'épilepsie ou un accident vasculaire cérébral, les neurones deviennent incapables de réabsorber le glutamate libéré dans les synapses et d'éviter l'afflux excessif de calcium. Au lieu d'exciter légèrement les synapses, le glutamate et le calcium y font de graves dégâts : l'architecture cellulaire des neurones atteints se désagrège, et des radicaux libres oxygène (des molécules très réactives) renforcent l'effet dévastateur. Ces lésions tuent alors les cellules ou déclenchent les mécanismes internes de suicide cellulaire.

La thérapie génique interromprait-elle cette désastreuse succession d'événements ? Pour nos premières expériences, nous avons cultivé quelques cellules cérébrales prélevées sur un rat, et nous avons injecté dans ces neurones un virus de l'herpès que nous avons modifié génétiquement : nous lui avons ajouté un gène qui code une protéine capable de transporter des molécules de glucose à travers la membrane cellulaire. Nous espérons que ce type de thérapie augmenterait l'apport de glucose au moment précis où les neurones atteints ont besoin d'énergie supplémentaire (afin d'évacuer le calcium excédentaire).

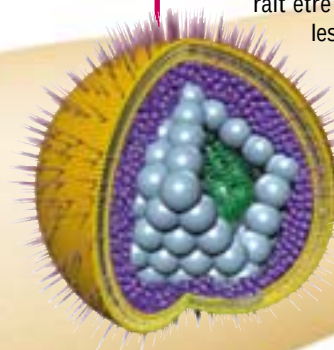
Les premières expériences ont montré que notre traitement augmente l'absorption du glucose et préserve le métabolisme des neurones soumis *in vitro* à des conditions équivalentes à celles d'une crise d'épilepsie ou d'un accident vasculaire cérébral. Puis d'autres expériences ont révélé une réduction des lésions provoquées par un accident cérébral chez des rats que l'on avait traités préventive-

Comment introduire des gènes dans les cellules nerveuses

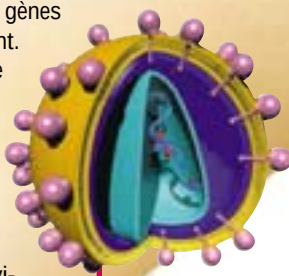
L'ADÉNOVIRUS, agent pathogène habituellement à l'origine de troubles respiratoires, peut modifier génétiquement les neurones. Sous sa forme normale, il endommage les cellules et déclenche une réaction immunitaire énergique ; aussi doit-on d'abord l'inactiver et réduire son immunogénicité.



LE VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX de type 1, agent responsable des boutons de fièvre, pourrait être un vecteur de gènes. Entre les éruptions, il reste souvent à l'état dormant dans les neurones sensoriels. Toutefois, comme les adénovirus, les virus de l'herpès non modifiés endommagent les cellules et déclenchent une réaction immunitaire.



LES RÉTROVIRUS introduisent leurs gènes dans l'ADN des cellules qu'ils infectent. De nombreux rétrovirus n'infectent que les cellules qui se divisent régulièrement et ne peuvent donc être utilisés pour la modification génétique des neurones. D'autres virus (de la famille dite des lentivirus, à laquelle appartient le virus du SIDA) peuvent infecter les cellules qui ne se divisent pas et serviront peut-être un jour pour une thérapie génique du système nerveux.



LES VIRUS ASSOCIÉS AUX ADÉNOVIRUS, des virus défectueux qui nécessitent un adénovirus pour se répliquer, n'endommagent pas les cellules nerveuses qu'ils infectent et ne provoquent pas de réaction immunitaire. Bien plus petits que d'autres virus également étudiés pour la thérapie génique, ils pourraient traverser plus facilement les petits pores de la barrière hémato-encéphalique. En revanche, leur petite taille limite la quantité d'information génétique qu'ils peuvent introduire dans les cellules.



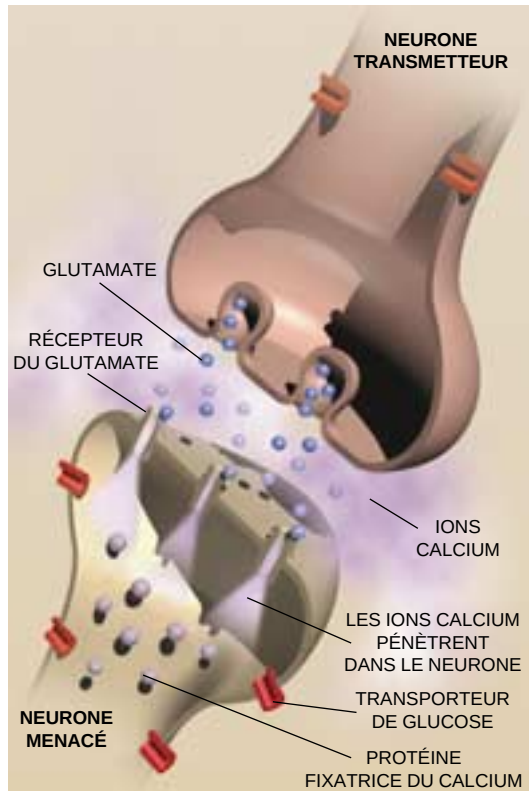
ment par le virus modifié. On ne sait pas prévoir le moment exact des crises d'épilepsie ou des accidents vasculaires cérébraux, mais, quelques heures après la crise, la thérapie génique protège encore les neurones.

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 les 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.

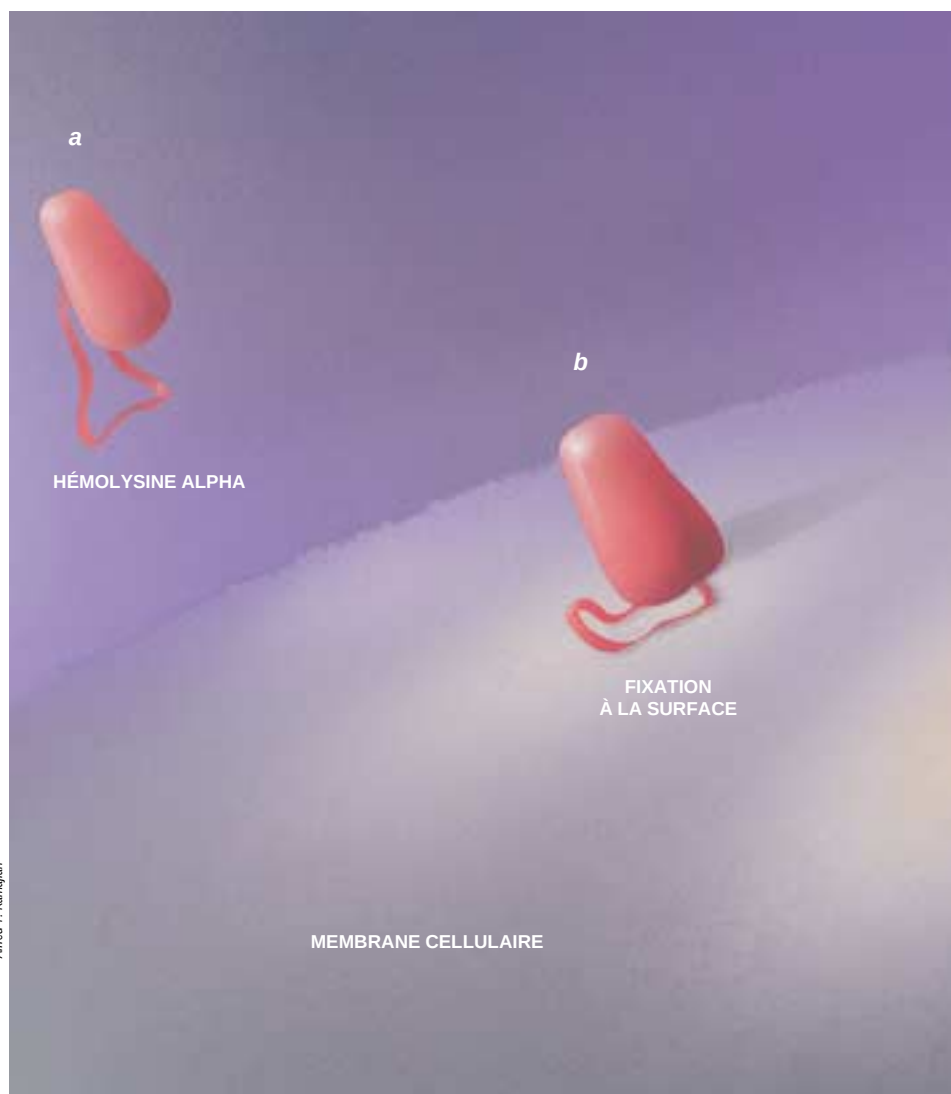
La membrane externe d'une cellule n'est pas une simple enveloppe : c'est une sentinelle moléculaire qui contrôle tout ce qui pénètre et tout ce qui sort de la cellule. Les substances nutritives et les molécules utiles entrent, les composés indésirables restent à l'extérieur et les déchets sont expulsés. 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. Kamajian