

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.

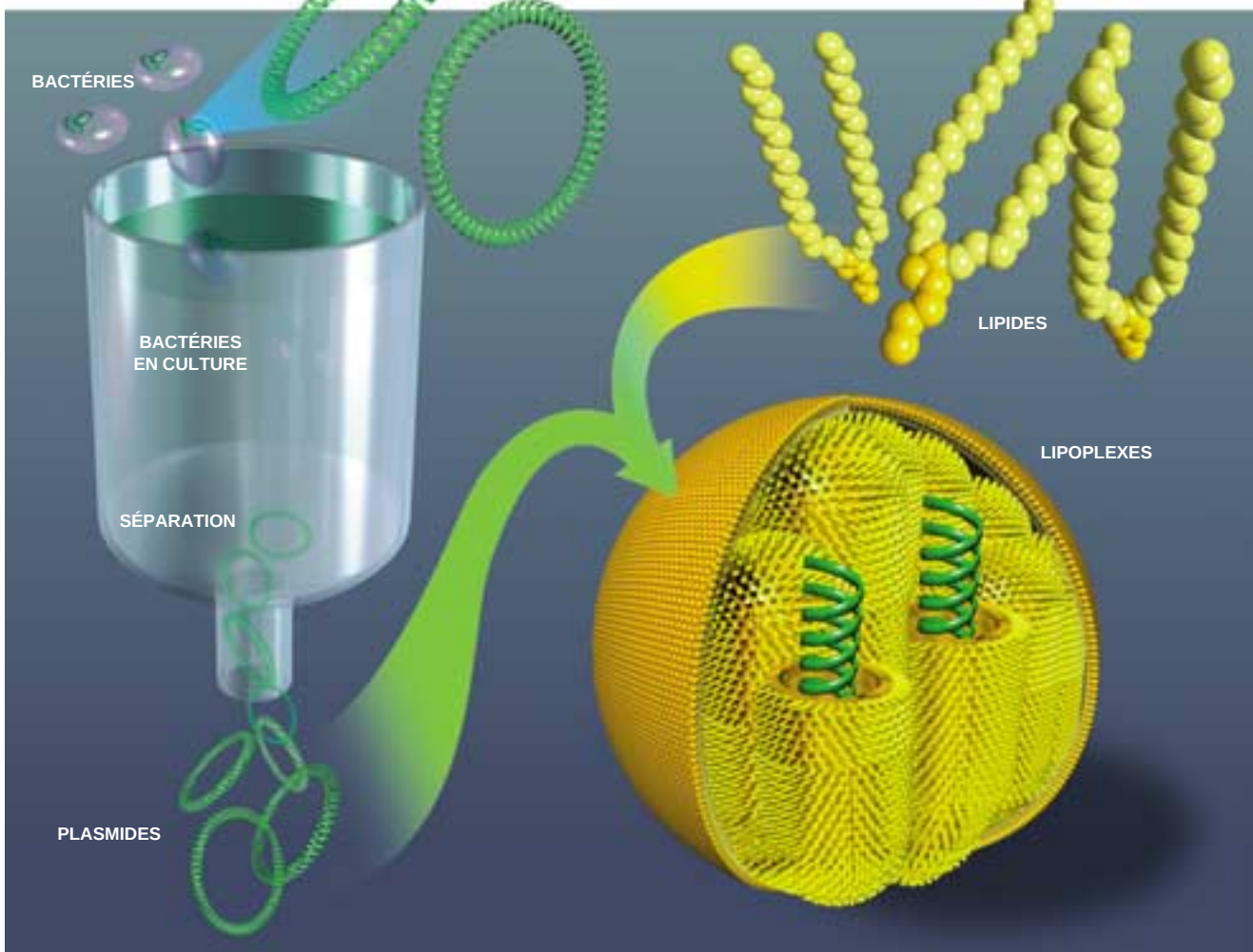
L'exploitation de la découverte

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



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.

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