

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 capteraient 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.

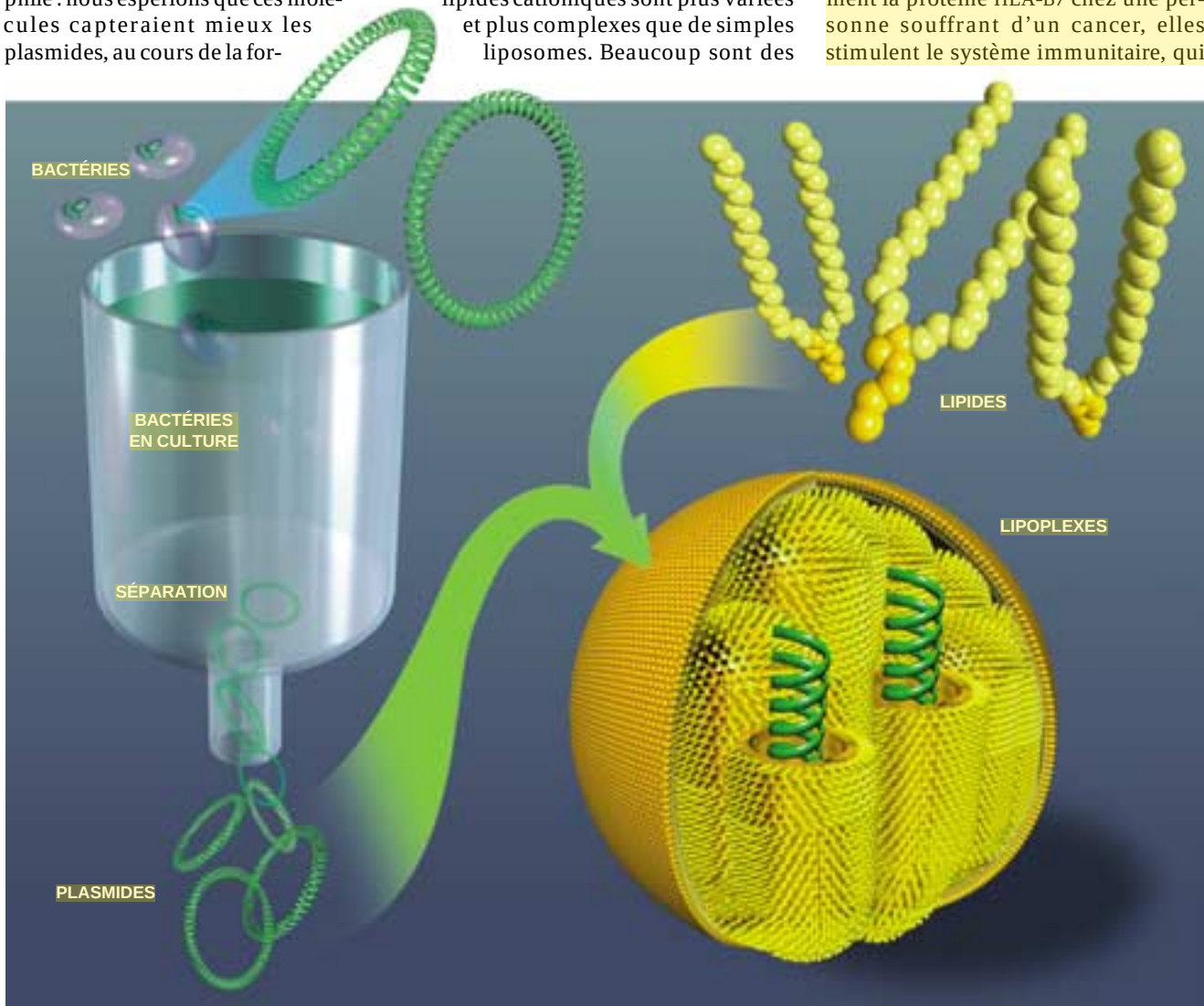
L'exploitation de la découverte

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

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.

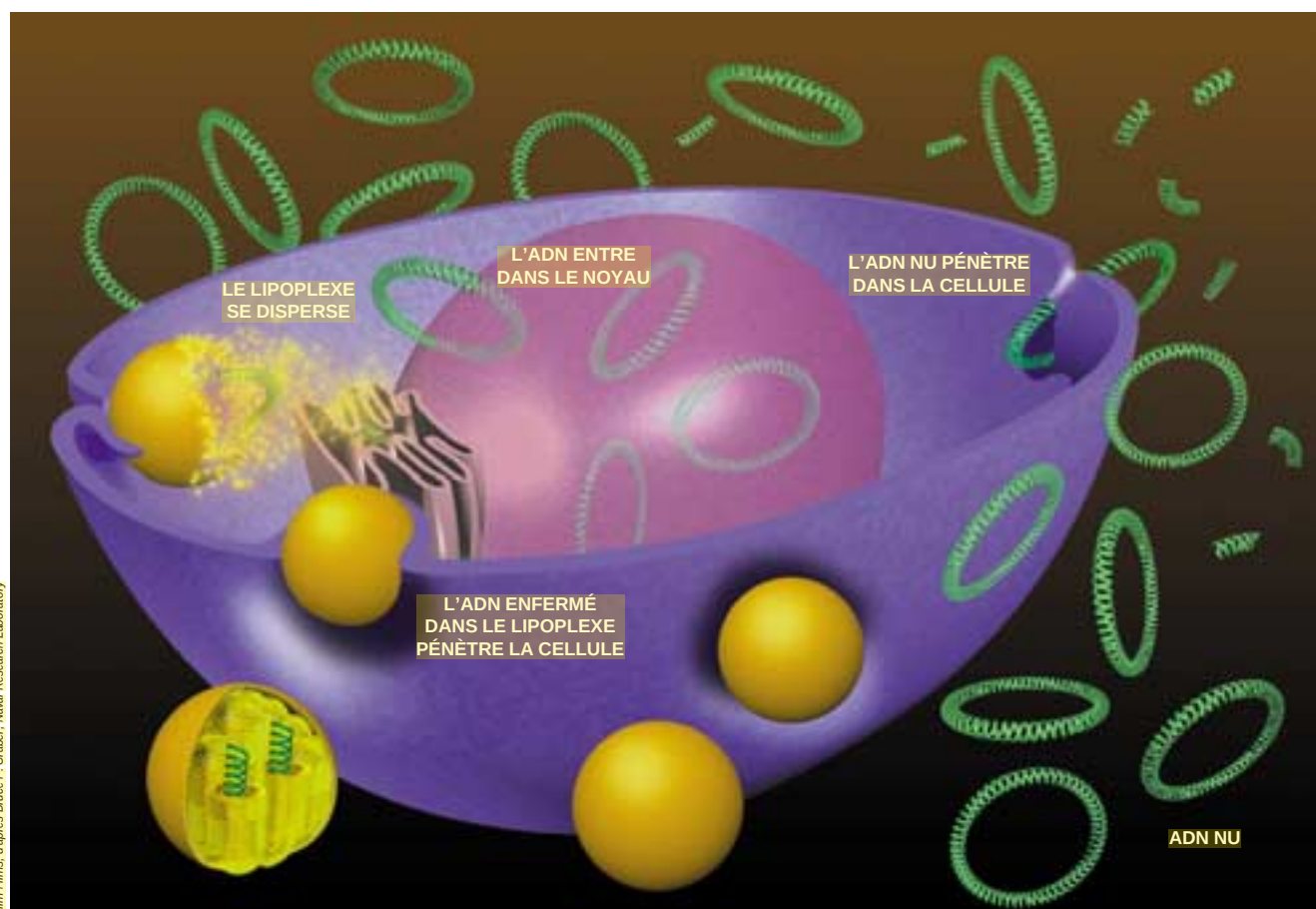
Les Laboratoires *Vical* ont également lancé une série d'essais cliniques avec des lipoplexes porteurs du gène de l'interleukine 2 (IL-2), une protéine qui transmet des signaux entre divers constituants du système immunitaire. Habituellement, les personnes atteintes d'un cancer du rein sont traitées 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



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.