

Nous avons d'abord introduit un commutateur biochimique dans l'hémolysine alpha en ajoutant une petite chaîne polypeptidique (de 11 à 53 acides aminés) au brin central de la protéine qui, normalement, perfore la membrane cellulaire. Un tel segment empêche la formation des pores; quand on élimine cet appendice à l'aide d'une enzyme nommée protéase, la molécule forme à nouveau des pores.

On pourrait choisir les commutateurs biochimiques de façon à ce que les hémolysines alpha ainsi formées ne percent des pores que dans des cellules cibles spécifiques. On pourrait diriger des hémolysines modifiées vers des cellules tumorales grâce à des fragments d'anticorps (spécifiques des cellules cancéreuses) insérés dans la protéine par génie génétique. Quand ces protéines hybrides atteindraient les cellules cancéreuses, les protéases libérées par les cellules cancéreuses activeraient la formation des pores (les cellules cancéreuses libèrent des protéases tumorales, des enzymes qui aident les cellules de la tumeur à s'échapper et à coloniser de nouveaux sites). Les hémolysines modifiées perceraient des trous dans les cellules cancéreuses, augmentant leur perméabilité et leur sensibilité aux médicaments cytotoxiques. Nous avons fabriqué des hémolysines alpha mutées activées par les protéases tumorales.

Nous tentons aussi d'introduire dans l'hémolysine alpha des commutateurs biochimiques qui, alternativement, ouvriraient et fermeraient les pores.

Des activateurs chimiques

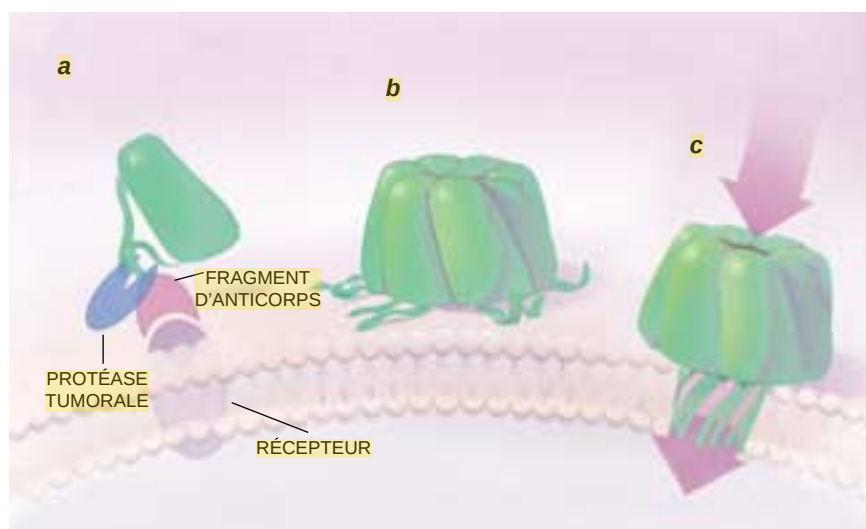
Nous avons ainsi inséré un commutateur dans l'hémolysine alpha, qui est activé par diverses petites molécules. Nous pensons produire par cette méthode des membranes artificielles, nommées biocapteurs, qui détecteraient les molécules toxiques, notamment les pesticides et les gaz neurotoxiques. Ainsi une hémolysine alpha mutée insérée dans la surface d'un liposome (une double couche de lipides formant une vésicule microscopique) forme un pore qui reste ouvert tant qu'un composé organique très réactif se lie à la région génétiquement modifiée de la molécule. On constate que le canal est ouvert, car le colorant fluorescent introduit dans le liposome au moment de son assemblage s'en échappe.

Nous avons également élaboré un commutateur chimique qui ouvre ou ferme les pores grâce à la fixation d'ions métalliques sur la protéine. Un tel commutateur serait utile pour le suivi de la pollution de l'eau, par exemple, à l'aide de biocapteurs. Le remplacement de cinq acides aminés dans le brin central de la protéine par cinq acides aminés histidine, crée un site de liaison pour le zinc et pour divers métaux, ce qui bloque la formation des pores. Une fois le pore ouvert, les ions peuvent l'obstruer en se liant au canal central,

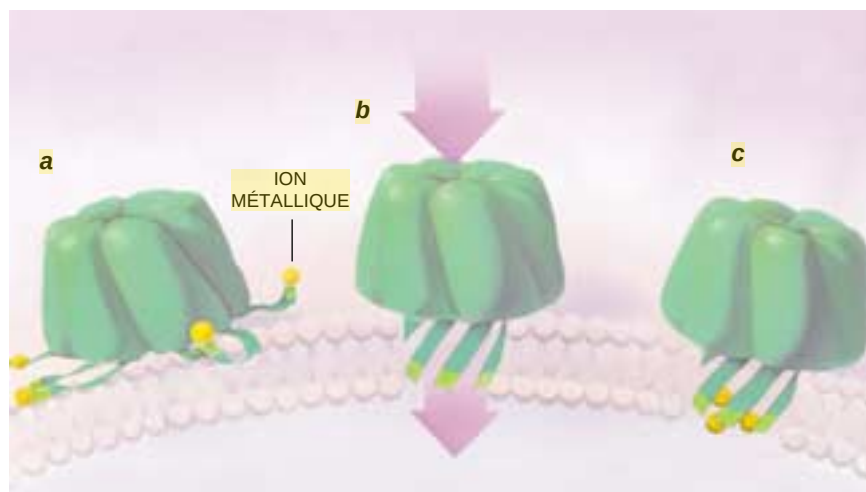
interdisant ainsi le passage des autres molécules.

Ces structures nommées H₅ (en raison des cinq molécules d'histidine), seraient des biocapteurs efficaces utilisables pour la recherche de polluants métalliques. On pourrait, par exemple, mesurer rapidement et en continu les concentrations en ions métalliques présents dans les eaux océaniques.

Grâce aux techniques du génie génétique appliquées à la structure H₅, nous avons produit des pores dont toutes les sous-unités ne sont pas iden-



2. LA PERFORATION DES CELLULES CANCÉREUSES facilite l'entrée des médicaments. Les biologistes ont mis au point une hémolysine alpha modifiée qui porte un fragment d'anticorps reconnu par certains récepteurs des cellules cancéreuses et qui empêche la formation des pores. Lorsque cette protéine modifiée atteint une cellule cancéreuse, les protéases tumorales (des protéines sécrétées par toutes les tumeurs) coupent le fragment d'anticorps (a). Lorsque les sept sous-unités de l'hémolysine alpha sont assemblées (b), le pore s'ouvre (c).



3. DES PORES DANS LES MEMBRANES CELLULAIRES peuvent s'ouvrir et se fermer sur commande. Lorsque des ions métalliques se fixent sur la protéine modifiée nommée H₅, ils empêchent la formation du canal (a). L'élimination des ions métalliques ouvre le pore (b); un nouvel apport d'ions métalliques referme le pore (c). On a utilisé cette technique pour introduire des composés chimiques cryoprotecteurs dans des cellules vivantes pour les conserver à basse température.

tiques (les recherches faites sur les molécules H_5 ont révélé que le brin central de la protéine naturelle d'hémolyse alpha tapisse l'intérieur des pores). Dans une des molécules obtenues, une des sous-unités contient un site où les ions métalliques peuvent se fixer. La fixation d'ions métalliques modifie le courant électrique créé dans le pore par une différence de potentiel qui lui est appliquée : la fluctuation du courant renseigne sur la concentration et la nature de l'ion fixé. Une série de tels biocapteurs pourrait

analyser un mélange de plusieurs substances. De surcroît, ces capteurs seraient extrêmement petits, puisque la liaison à un seul pore entraîne une variation mesurable du courant.

On peut introduire d'innombrables modifications dans les protéines perforantes et créer ainsi tout un éventail de biocapteurs potentiels. Nous mettons actuellement au point des capteurs pour des substances non métalliques : des brins d'ADN pourraient ainsi être détectés lors de leur passage à travers de tels pores.

Il existe des canaux naturels dans les membranes cellulaires qui sont activés par un stimulus physique, par exemple par des impulsions mécaniques ou électriques appliquées à la membrane. Toutefois, l'activation par la lumière semblait plus intéressante : la lumière n'interfère pas avec les mécanismes cellulaires et son application est parfaitement maîtrisable dans le temps et dans l'espace.

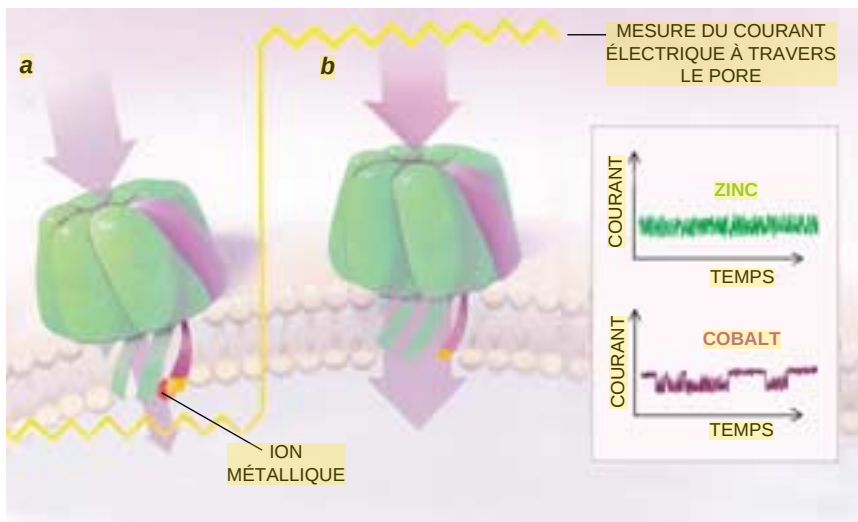
Des commutateurs photosensibles

Les nitrobenzyles sont des structures photosensibles, et nous avons mis au point un dérivé, nommé acide bromonitrophénylacétique, qui après s'être lié à la molécule hémolyse alpha inhibe la formation des pores.

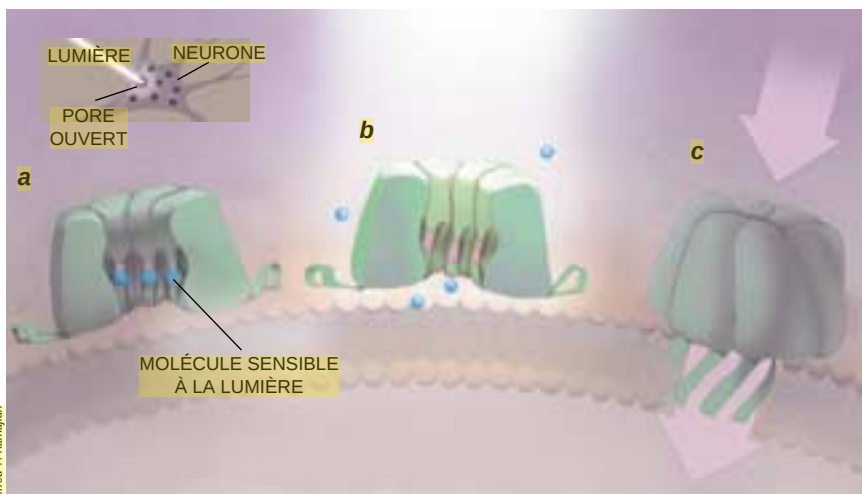
À cette fin, nous avons d'abord introduit un unique acide aminé cystéine dans le site clé de la protéine. Lorsque la cystéine réagit avec l'acide bromonitrophénylacétique, la protéine est inactivée. La protéine serait activée par des rayons ultraviolets, à des longueurs d'onde inoffensives pour la plupart des cellules. Les biologistes pourraient construire des molécules formant des pores activés par un rayonnement d'une longueur d'onde particulière, et inhibés par une autre longueur d'onde, ou encore des commutateurs hybrides activés par la lumière et inhibés par des ions métalliques.

Cette technique est déjà utilisée en laboratoire : les chercheurs doivent parfois rendre poreuses certaines cellules d'un échantillon de tissu, sans modifier le comportement des autres cellules. On peut alors introduire de petites molécules pour évaluer l'activité de certaines cellules sans que ne s'en échappent les protéines vitales. Nous avons réussi à perméabiliser des neurones en culture, en les exposant à la lumière ; des hémolysines modifiées par génie génétique et exposées à la lumière y ont créé des pores ; les autres neurones sont restés intacts. L'administration des médicaments est l'une des applications les plus prometteuses des protéines perforantes. Les médicaments pourraient, par exemple, être transportés dans des liposomes et libérés sur commande, par des pores artificiels implantés dans la membrane cellulaire.

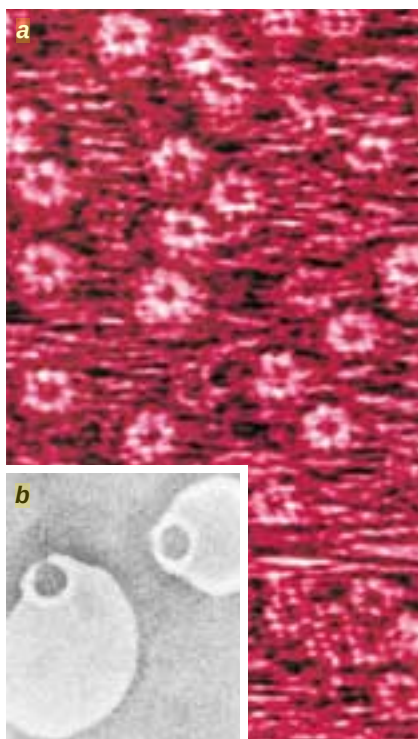
Les biologistes s'intéressent aux enzymes encapsulées, voire aux cellules



4. DES BIOCAPTEURS constitués de pores artificiels détectent une grande variété de substances chimiques. Une hémolyse alpha a été modifiée : une de ses sept sous-unités (en violet) fixe des ions métalliques. Elle se ferme partiellement lorsque le métal s'y fixe (a) et elle s'ouvre lorsque le métal est éliminé (b). L'amplitude et la durée des variations d'un courant électrique appliqué aux pores révèlent la nature du métal présent (voir le cartouche) ; la fréquence des variations de courant indique la concentration en ions métalliques.



5. UN RAYON DE LUMIÈRE peut ouvrir une voie d'accès dans les cellules. La lumière est dirigée sur des cellules cibles, par exemple sur un neurone (voir le cartouche) avec une très grande précision, de sorte que l'on peut sélectionner les cellules à perméabiliser. Les molécules photosensibles attachées à l'hémolyse alpha empêchent la formation d'un pore (a) jusqu'au moment où la lumière les élimine (b) et permet l'ouverture du pore (c).



6. PORES MICROSCOPIQUES ouverts par diverses protéines. L'hémolysine alpha forme généralement des pores de deux nanomètres de diamètre, mais certains atteignent six nanomètres (a). La streptolysine O forme des pores dont le diamètre dépasse 30 nanomètres (b).

encapsulées, protégées des attaques du système immunitaire par leur enveloppe. Une fois les enzymes conduites sur le site choisi, elles détruiraient les substances toxiques qui s'accumulent chez les personnes ayant des maladies génétiques, par exemple la phénylcétonurie (l'organisme ne métabolise pas correctement l'acide aminé phénylalanine, et les cellules nerveuses peuvent parfois être endommagées).

Des cellules encapsulées permettraient d'administrer, par exemple, de l'insuline à des personnes ayant un diabète insulino-dépendant. L'encapsulation de médicaments, d'enzymes ou de cellules dans des membranes portant des pores artificiels offrirait un moyen de contrôler le site, le moment de l'administration des médicaments et la dose administrée. On tente de modifier génétiquement d'autres protéines bactériennes formant des pores, notamment la streptolysine O, pour obtenir des propriétés différentes.

Nous essayons aussi d'insérer des activateurs et des commutateurs dans des pores (des polypeptides dérivés de structures naturelles), selon la méthode mise au point par Maurice Montal et

ses collègues de l'Université de San Diego. Des protéines fondées sur l'hémolysine alpha pourraient, par exemple, servir d'agents antimicrobiens si elles perçaient sélectivement des trous dans les membranes externes des micro-organismes pathogènes.

Diverses modifications de l'hémolysine alpha par génie génétique sont envisageables. Nous essayons d'améliorer la stabilité mécanique et thermique des pores de l'hémolysine alpha, utilisés comme biocapteurs. D'autres équipes cherchent comment réduire l'immunogénicité de la protéine (c'est-à-dire diminuer sa capacité à activer le système immunitaire), pour de potentielles applications pharmacologiques.

Si nous arrivons à relever ces défis, cette technique offrira encore d'autres possibilités. Les protéines perforantes pourraient servir de composants conducteurs dans des dispositifs électroniques moléculaires. Bien que ces protéines soient relativement grandes par rapport aux composants utilisés dans ce type de dispositifs électroniques, elles ont des propriétés intéressantes, notamment la capacité de reconnaître d'autres molécules, ce que des matériaux inorganiques ne peuvent faire. On pourrait même concevoir des membranes sélectives qui ne laisseraient passer que certaines molécules et serviraient de filtres pour la purification de substances telles que les médicaments, le sang ou les eaux contaminées. Le champ d'application des protéines formant des pores est tout juste entrouvert.

Hagan BAYLEY, professeur de chimie et de biochimie, dirige le département de biochimie médicale et de génétique de l'Université du Texas.

C. CHANG et al., *A Photogenerated Pore-Forming Protein*, in *Chemistry and Biology*, vol. 2, n° 6, pp. 391-400, juin 1995.

R. PANCHAL et al., *Tumor Protease-Activated, Pore-Forming Toxins form a Combinatorial Library*, in *Nature Biotechnology*, vol. 14, n° 7, pp. 852-856, juillet 1996.

M. RUSSO et al., *Reversible Permeabilization of Plasma Membranes with an Engineered Switchable Pore*, in *Nature Biotechnology*, vol. 15, n° 3, pp. 278-282, mars 1997.

O. BRAHA et al., *Designed Protein Pores as Components for Biosensors*, in *Chemistry and Biology*, vol. 4, n° 7, pp. 497-505, juillet 1997.

Les vaccins

RINO RAPPUOLI • SERGIO ABRIGNANI • GUIDO GRANDI

Grâce au génie génétique, le champ de la vaccination préventive a été étendu à l'immunothérapie des cancers, des infections chroniques, des maladies auto-immunes et des allergies.

La lutte entre l'homme et la maladie est passée par une première phase, où les maladies traduisaient les volontés divines. Pour guérir, il fallait circonvenir les divinités immortelles par le truchement des sorciers et autres grands prêtres.

Dans une deuxième période, qui a commencé au V^e siècle avant notre ère avec Hippocrate, les scientifiques ont pris le pas sur les magiciens et étudié les mécanismes des maladies : l'identification des symptômes a permis la recherche de traitements. Ce diagnostic de l'affection reste cependant fataliste : dans cette vision, l'homme ne peut éviter la maladie, et son savoir s'attache uniquement au soin des maladies déclarées.

La troisième période sera celle de la médecine du futur où la prévention évitera à l'homme certaines maladies. Les vaccins et les substances stimulant le système immunitaire seront des outils thérapeutiques puissants et économiques qui joueront un rôle primordial.

Notre organisme est perpétuellement agressé par les parasites, les bactéries et les virus. La tâche du système immunitaire est d'identifier ces agresseurs et de déclencher une réaction capable de les éliminer. Les trois mécanismes de réaction de l'organisme sont représentés sur la figure 1.

Notre système immunitaire est remarquable : après avoir éliminé l'envahisseur, comme c'est (fort heureusement) souvent le cas, il garde une mémoire de l'agent infectieux : ainsi notre corps sait reconnaître et peut prévenir les futures attaques du même agent. Les éléments clefs de la mémoire immunitaire sont des lymphocytes *T* qui survivent longtemps (parfois toute la vie de l'individu). Lorsqu'ils rencontrent les micro-organismes infec-

tieux dont ils sont spécifiques, ces lymphocytes *T* stimulent les lymphocytes *B* qui produisent des anticorps et activent les précurseurs des lymphocytes *T* cytotoxiques, qui détruisent les cellules infectées.

Le principe de la vaccination apparaît clairement. Elle nous expose à un « matériel biologique » qui imite l'agent infectieux, de sorte que le système immunitaire organise la résistance. Pour vacciner contre un agent pathogène, on inocule dans l'organisme soit un agent tué, soit un agent vivant incapable de déclencher la maladie, soit un fragment purifié de l'agent.

Qu'est-ce qu'un vaccin ?

En 430 ans avant notre ère, Thucydide a décrit des personnes qui étaient devenues résistantes à une maladie : lors d'une épidémie à Athènes (peut-être de fièvre typhoïde), les personnes qui avaient survécu à l'infection pouvaient soigner les malades sans crainte de rechuter. Les pratiques visant à conférer artificiellement une immunité sont également très anciennes. En 590, en Asie, on a rapporté des tentatives de « vaccination » de personnes saines contre la variole ; on leur injectait des sécrétions prélevées, chez un malade, sur une lésion, pour les rendre résistantes à des expositions ultérieures et éviter qu'elles ne contractent cette maladie mortelle. Il s'agit vraisemblablement d'une pratique très ancienne.

Au Moyen Âge, cette pratique s'est répandue vers l'Europe. La vaccination présentait des risques puisque quatre pour cent des personnes vaccinées étaient contaminées et mouraient. En 1796, le médecin anglais Jenner, décida d'utiliser un matériel

moins dangereux dérivé de lésions bovines pour vacciner un garçon contre la variole : ce dernier fut protégé lors des expositions ultérieures à la maladie. L'explication scientifique de la vaccination ne vint qu'un siècle plus tard, lorsqu'on découvrit que les maladies infectieuses sont provoquées par des micro-organismes, et lorsque Pasteur utilisa le virus inactivé de la rage pour vacciner ses patients. En 1977, grâce aux efforts coordonnés par l'Organisation mondiale de la santé, la vaccination avait complètement éradiqué le virus de la variole.

Cependant, les maladies infectieuses représentent encore la principale cause de mortalité dans le monde, et, après avoir régressé au cours du XX^e siècle, le taux de la mortalité due à ces maladies augmente à nouveau. Des maladies émergentes telles que le SIDA, l'hépatite C, la maladie de Lyme, ou les fièvres hémorragiques s'ajoutent aux maladies anciennes que l'on pensait maîtriser, telle la tuberculose. De surcroît, le développement de la résistance aux médicaments antimicrobiens constitue une menace.

Aussi, dans les années 1980, l'industrie biomédicale décida d'investir dans la recherche de vaccins, en s'appuyant sur les nouveaux outils de la biologie moléculaire et sur une meilleure compréhension du fonctionnement du système immunitaire. À la suite de cet effort, quelques vaccins ont été mis sur le marché, notamment contre l'hépatite B et contre la coqueluche.

En 1976, M. Hilleman et ses collègues de la Société Merck montrèrent que l'injection d'antigènes purifiés extraits du plasma de personnes infectées par le virus de l'hépatite B pro-