

plasmides dans les cellules, à augmenter la production des protéines du vaccin et à accroître les réponses immunitaires grâce à des adjuvants.

De ces travaux sont issus de nouveaux modes d'administration des vaccins. Ils sont capables d'introduire les plasmides dans un nombre plus élevé de cellules cibles, y compris des cellules immunitaires. Par exemple, des patchs transdermiques et d'autres systèmes sans aiguille, tels le *Gen Gun* et le *Bioject*, qui utilisent de l'air pressurisé pour injecter le vaccin, administrent les plasmides dans la peau, où se trouve une forte concentration de sentinelles immunitaires.

Ces méthodes forcent aussi physiquement les plasmides à pénétrer en plus grande quantité et dans un plus grand nombre de cellules que ne le ferait l'injection à l'aide d'une aiguille. Pour que des vaccins administrés dans un muscle ou dans la peau à l'aide d'une seringue obtiennent des résultats équivalents à ceux des dispositifs à air pressurisé, l'injection peut être suivie d'une électroporation : sous l'effet d'une série d'impulsions électriques, des pores s'ouvrent temporairement dans les membranes cellulaires, si bien que les plasmides entrent plus facilement dans les cellules cibles. L'électroporation peut augmenter jusqu'à 1 000 fois le nombre de plasmides pénétrant dans les cellules.

La renaissance de l'ADN

Les constructions génétiques à base de plasmides ont aussi été améliorées. On peut désormais faire en sorte que la cellule lise les instructions du gène de façon à les exécuter plus facilement. Dans le code génétique, les composants de base des protéines que sont les acides aminés sont définis par un ensemble de trois « lettres » dans l'ARN messager codé par l'ADN, formant un codon. Certains acides aminés sont déterminés par plusieurs codons synonymes, mais les cellules « préfèrent » en général l'un d'eux, ce qui veut dire qu'elles le traduisent plus efficacement que les autres pour l'intégrer dans la séquence de la protéine. L'astuce consiste donc à choisir les codons les plus favorables à la traduction, ce qui augmente la production de la protéine correspondante par la cellule. D'autres modifications de la séquence du gène rendent les ARN messagers transcrits

à partir du gène plus stables et précis, ce qui accélère la synthèse de la protéine réalisée à partir de ces ARN.

On peut aussi faire en sorte que la première séquence d'ARN traduite par la cellule pour fabriquer une protéine – la « séquence leader » – augmente la stabilité de cette dernière. Certaines séquences leaders peuvent marquer une protéine comme faisant partie de celles que la cellule doit sécréter dans le milieu extracellulaire ; ce marquage est souhaitable, car il permet aux cellules immunitaires de rencontrer les protéines étrangères à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des cellules transfectées. Les deux situations entraînent des réactions immunitaires légèrement différentes et leur combinaison augmente l'immunité globale produite par le vaccin.

LES AUTEURS



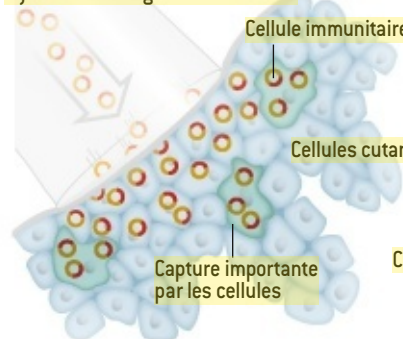
Matthew MORROW et David WEINER sont chercheurs à l'Université de Pennsylvanie. D. Weiner, professeur de médecine, y dirige le programme Thérapie génique et vaccins. Il est aussi consultant pour l'Administration américaine de l'alimentation et des médicaments (FDA) et pour des sociétés pharmaceutiques.

L'EFFET DE L'ADN RENFORCÉ

L'efficacité des vaccins et des thérapies à base d'ADN, sous forme de plasmides, a été améliorée par différentes méthodes. Celles-ci accroissent le nombre de plasmides intégrés par les cellules, augmentent la production des protéines antigéniques et renforcent la réaction immunitaire.

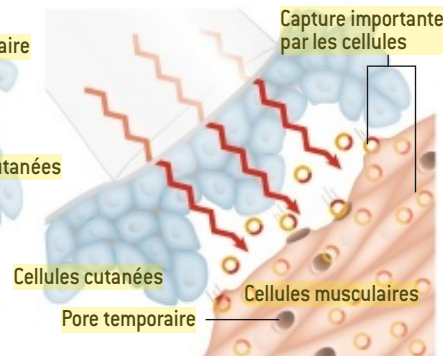
UN MODE MEILLEUR D'ADMINISTRATION DES PLASMIDES

Injection sans aiguille



Des systèmes sans aiguille injectent le vaccin dans la peau, où sont concentrées des cellules immunitaires. En comparaison des injections classiques, les plasmides sont plus nombreux à pénétrer dans les cellules immunitaires cutanées.

DISPOSITIF D'ÉLECTROPORATION



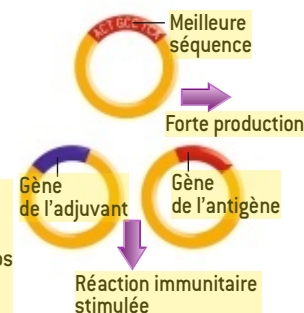
Une faible stimulation électrique, l'électroporation, accroît la quantité de plasmides qui entrent dans les cellules après leur injection. En effet, chaque impulsion électrique ouvre brièvement des pores dans la membrane cellulaire, laissant passer des plasmides.

UNE CONCEPTION OPTIMISÉE DES PLASMIDES

Les instructions génétiques de production d'une protéine présentes sur un plasmide peuvent être lues en utilisant différentes séquences de « lettres » de l'ADN. Le choix de l'une ou l'autre de ces séquences permet d'augmenter la quantité de protéine synthétisée.

UNE STIMULATION IMMUNITAIRE PLUS EFFICACE

La synthèse d'adjuvants, substances stimulant les cellules immunitaires, peut être codée par des gènes insérés dans les plasmides. Les adjuvants, fabriqués alors en même temps que les antigènes, renforcent les réponses immunitaires dirigées contre ces derniers.



Précisions graphiques

✓ BIBLIOGRAPHIE

A. Abbott, Therapeutic HIV vaccines show promise, *Nature*, vol. 466, p. 539, 2010.

M. Ingolotti et al., DNA vaccines for targeting bacterial infections, *Expert Rev. Vaccines*, vol. 9, pp. 747-763, 2010.

M.A. Liu, Gene-based vaccines : Recent developments, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, vol. 12, pp. 86-93, 2010.

F. Martinon et al., Persistent immune responses induced by a human immunodeficiency virus DNA vaccine delivered in association with electroporation in the skin of nonhuman primates, *Hum. Gene Ther.*, vol. 20, pp. 1291-130, 2009.

J. Rice et al., DNA vaccines : Precision tools for activating effective immunity against cancer, *Nature Review Cancer*, vol. 8, pp. 108-120, 2008.

Dernier perfectionnement, les adjuvants, généralement ajoutés aux vaccins usuels, pour stimuler le système immunitaire peuvent orienter la réaction immunitaire vers une forme plutôt qu'une autre. Par exemple, ils peuvent favoriser une plus grande production de lymphocytes *T*, qui recherchent et tuent les cellules infectées dans l'organisme, plutôt que la production de lymphocytes *B* qui libèrent les anticorps, bloquant l'entrée des agents pathogènes dans les cellules. Ainsi, le Vaxfectin augmente de 200 fois la quantité d'anticorps produits en réponse à un vaccin à ADN contre la grippe. Un autre adjuvant, *Resiquimod*, est utilisé pour déclencher une réaction immunitaire à base de lymphocytes *T* et d'anticorps.

Coder les adjuvants

Par ailleurs, au lieu d'ajouter des adjuvants à la formulation finale du vaccin, ce qui pose parfois un problème de stabilité, les concepteurs de vaccins à ADN peuvent incorporer directement le gène codant

les molécules d'adjuvant dans le plasmide du vaccin. Les cellules qui intègrent les plasmides fabriquent alors l'adjuvant, ainsi que les protéines du vaccin. Quand un adjuvant codé par un gène est ajouté à un vaccin à ADN, même lorsque les plasmides ont déjà été optimisés, il multiplie par cinq les réponses immunitaires.

Par ailleurs, à cause de leur origine bactérienne, les plasmides ont un pouvoir adjuvant intrinsèque. En effet, certaines séquences de l'ADN bactérien (séquences CpG) sont reconnues par l'organisme comme des signaux de danger, et leur reconnaissance provoque l'activation de mécanismes inflammatoires qui augmentent la puissance des réponses immunitaires.

Avec des plasmides optimisés et l'amélioration des modes d'administration, la technologie de l'ADN nu était prête à faire son retour au moment où l'essai STEP rencontrait l'échec, courant 2009. Qui plus est, l'approche des vaccins à ADN est devenue prometteuse au-delà de la vaccination classique, notamment parce qu'elle apporte des solutions thérapeutiques dans d'autres domaines.

Un grand nombre de traitements à base d'ADN sont plus avancés que les vaccins. À l'opposé des médicaments classiques, qui se présentent souvent sous forme de petites molécules, les thérapies à ADN apportent un gène pour traiter une maladie. Cependant, contrairement à la thérapie génique, le plasmide ne s'intègre pas de façon permanente dans le génome cellulaire du receveur, ni même ne persiste dans les cellules, ce qui évite des complications qui ont entravé les progrès des thérapies géniques reposant sur l'utilisation de rétrovirus (par exemple, parce qu'une séquence du vecteur s'intègre dans un gène important pour la cellule hôte, ou à proximité).

Comme souvent pour les nouvelles technologies, les premiers succès des thérapies à base de plasmides ont été obtenus chez les animaux. L'une d'elles, déjà autorisée aux États-Unis pour une utilisation chez le porc, vise à prévenir la mort du fœtus chez la truie. Administré à des truies gravides et sous électroporation, le plasmide pénètre dans les cellules de l'animal et code la production de l'hormone de libération de l'hormone de croissance, qui favorise la survie du fœtus en gestation. Ce traitement ne nécessite qu'une seule injection, ce qui est de bon augure pour les thérapies humaines.

VIH : la piste de l'ADN

Les bases de la vaccination par ADN sont apparues dans les années 1990-1992. Son étonnante simplicité technique a tout d'abord semblé suspecte, faisant s'interroger sur son innocuité biologique dans un contexte de prudence vis-à-vis des organismes génétiquement modifiés (OGM). Cette appréhension a rapidement disparu lorsque les chercheurs ont montré que les vaccins à ADN ne s'intègrent pas dans le génome des cellules et que leur durée de vie *in vivo* est limitée. Néanmoins, les premières expériences ont été particulièrement décevantes dans la mesure où les résultats encourageants obtenus chez la souris n'étaient pas reproduits chez l'homme. Comme l'indiquent M. Morrow et D. Weiner, de nombreuses études ont alors cherché à optimiser cette approche vaccinale.

Dans ce contexte, l'Union européenne a financé plusieurs

projets reposant sur cette stratégie, notamment destinés au développement de vaccins contre le VIH. En collaboration avec la société finlandaise *FIT Biotech* et l'Université de Tartu, en Estonie, nous avons participé à l'étude d'un vaccin à ADN particulièrement prometteur, dans le cadre du projet européen EPIVAC. En plus des améliorations décrites par M. Morrow et D. Weiner, le plasmide utilisé comportait un gène lui permettant de faire passer la durée d'expression des antigènes vaccinaux de 3 jours à 12 jours. De plus, chez le macaque, ce vaccin à ADN, associé à une électroporation au niveau du site d'injection dans la peau, a stimulé une immunité de type cellulaire (production de lymphocytes *T*) d'une intensité jamais atteinte auparavant et d'une stabilité de plusieurs années, ce qui est recherché pour limiter le

nombre de rappels de vaccinations nécessaires.

Nos recherches suggèrent que les cellules de Langerhans, sentinelles du système immunitaire localisées dans la peau et les muqueuses, jouent un rôle important dans l'efficacité potentielle de cette vaccination. Ce candidat vaccin est maintenant entré en phases cliniques, en particulier dans l'essai LIGHT, réalisé en France par l'Agence nationale de recherche sur le sida et les hépatites virales (ANRS) chez des volontaires sains, et dans un essai de vaccination thérapeutique réalisée en Afrique du Sud chez des patients infectés par le VIH.

**Frédéric Martinon
et Roger Le Grand**

Institut des maladies émergentes et thérapies innovantes, DSV/CEA, Fontenay-aux-Roses, et Université Paris-Sud, Orsay.