

des lymphocytes *T* d'un patient, en les exposant à des substances qui les font se multiplier et devenir plus actifs contre le cancer ou les infections virales, et en réimplantant ces lymphocytes stimulés dans le corps du patient. Nous avons commencé à participer à ces travaux il y a 20 ans, dans l'actuel Centre médical militaire américain Walter Reed, à Bethesda. En nous inspirant des travaux de diverses équipes, nous avons cherché à améliorer les méthodes de croissance des lymphocytes *T in vitro*. À cette époque, on ne pouvait cultiver en laboratoire les lymphocytes *T* d'un donneur qu'en utilisant des cocktails complexes de messagers chimiques ou en extrayant du sang du donneur un autre type de cellules, les cellules dendritiques, qui déclenchent la maturation des lymphocytes *T* et leur multiplication.

Nous pensions que nous pourrions simplifier ce processus à l'aide de cellules dendritiques artificielles : de minuscules billes magnétiques, légèrement plus petites que les lymphocytes *T*, auxquelles nous avions fixé, en surface, deux protéines qui imitaient celles portées par les cellules dendritiques. Mélangées aux lymphocytes *T*, ces billes se sont révélées très efficaces : réapprovisionnée en billes toutes les deux semaines environ, une colonie de lymphocytes *T* actifs se multipliait pendant plus de deux mois, augmentant 10^{12} fois sa population.

Quand nous avons commencé à tester cette approche en utilisant des échantillons de sang prélevés sur des volontaires séropositifs, nous avons découvert, à notre grande surprise, que les lymphocytes *T* produits et réinjectés dans le corps des patients repoussent – temporairement – les assauts du VIH. Nous avons publié nos résultats en juin 1996 ; nous ignorions encore pourquoi notre méthode à base de billes magnétiques augmentait la résistance des lymphocytes *T* à l'infection par le VIH. Le mystère s'est éclairci quelques mois plus tard.

Pendant que nous mettions au point notre système de croissance des lymphocytes *T*, d'autres chercheurs ont découvert une faille importante dans l'attaque du VIH. Au tout début de l'épidémie du sida, des chercheurs avaient identifié un petit nombre d'individus qui semblaient résistants à l'infection par le VIH, malgré de multiples expositions au virus. Vers la fin 1996, plusieurs équipes ont montré que le VIH pénètre dans les cellules en se fixant à une protéine, le récepteur CCR5, présente

à la surface des lymphocytes *T* auxiliaires et de certaines autres cellules ; cette molécule est aussi probablement impliquée dans la réponse inflammatoire à une infection. À l'inverse, des personnes naturellement privées de cette protéine ne sont pas infectées.

Bloquer l'entrée du VIH

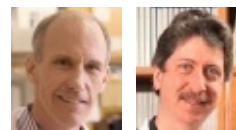
Chez ces personnes, le gène qui code la protéine CCR5 est raccourci de 32 nucléotides (les « lettres » A, T, C, G de l'« alphabet » de l'ADN) et la protéine synthétisée est incapable de rejoindre la surface cellulaire. Environ un pour cent des Caucasiens ont hérité de deux copies de ce gène défectueux, nommé *CCR5-Delta32*, ce qui rend leurs cellules résistantes à l'infection par le VIH. La mutation est plus rare chez les Amérindiens, les Asiatiques et les Africains. Les individus présentant cette mutation paraissent en bonne santé, bien qu'ils puissent être plus sensibles au virus du Nil occidental. Les personnes qui n'ont hérité que d'une copie du gène *CCR5-Delta32* sont encore sensibles au VIH, mais le délai entre leur infection initiale et les stades ultérieurs de la maladie est en moyenne plus long.

Depuis, l'étude de CCR5 a montré que la protéine peut être bloquée par des messagers chimiques nommés bêta-chimio-kines, qui la rendent indisponible pour le VIH. La découverte de ce blocage du récepteur CCR5 a conduit à toute une classe de médicaments anti-VIH. Toutefois, le blocage obtenu est incomplet : il est difficile de maintenir une couverture totale et continue de tous les récepteurs CCR5 sur toutes les cellules qui les portent. En outre, le VIH mute au fil de ses répliquations et échappe parfois au blocage.

La découverte du rôle de la protéine CCR5 dans l'infection par le VIH nous a fourni une piste pour expliquer la résistance au virus des lymphocytes *T* dont nous avons stimulé la croissance à l'aide de billes magnétiques : de fait, nous avons constaté que, lorsqu'ils sont activés par les billes magnétiques, les lymphocytes *T* stoppent leur production de protéine CCR5. Et sans cette protéine, le VIH ne peut pénétrer dans les cellules.

Arrivés à ce point, nous avons envisagé un nouveau traitement contre le VIH, fondé à la fois sur notre méthode de stimulation des lymphocytes *T* auxiliaires et sur le rôle de CCR5 dans l'entrée du virus.

LES AUTEURS



Carl JUNE est médecin et chercheur à l'École de médecine Perelman de l'Université de Pennsylvanie, aux États-Unis.

Bruce LEVINE est immunologiste dans la même institution, où il dirige la Cellule clinique et le Service de production des vaccins.

En chiffres

- ✓ En 2009, 33 millions d'individus vivaient avec le VIH, dont 22,5 millions en Afrique subsaharienne.
- ✓ Chaque jour, 5 000 personnes décèdent d'une maladie liée au sida et 6 800 contractent le virus.
- ✓ Un tiers seulement des personnes nécessitant un traitement anti-VIH y ont accès.
- ✓ Les thérapies antirétrovirales augmentent l'espérance de vie des malades de plusieurs dizaines d'années quand elles sont commencées au tout début de l'infection et prises régulièrement.

En collaboration avec Kristen Hege et Dale Ando, de la Société de biotechnologie *Cell Genesys*, à San Francisco, nous avons mené des essais cliniques chez l'homme afin de nous assurer de l'innocuité de lymphocytes *T* génétiquement modifiés pour résister au VIH selon une approche inspirée des résultats sur CCR5 – et multipliés à l'aide de nos billes magnétiques. Ces cellules se sont révélées sûres et ont survécu pendant plusieurs années après injection. Toutefois, la modification génétique que nous étudions n'avait qu'un effet modeste sur la réplication du VIH chez les patients, et *Cell Genesys* a mis fin à ces travaux.

En 2004, alors que nous avions rejoint l'Université de Pennsylvanie, D. Ando nous proposa une deuxième expérience. Le Laboratoire *Sangamo BioSciences* avait mis au point une technique pour couper les brins d'ADN en des endroits précis. Cette méthode était différente des autres approches – et beaucoup plus efficace –, car elle cibait une séquence de gène spécifique pour la modifier. Auparavant, on ne savait pas contrôler quels gènes, ou sections de gènes, étaient modifiés.

La technique de *Sangamo BioSciences* est fondée sur la combinaison de deux types de protéines produites par l'orga-

nisme : des protéines qui se lient spécifiquement à l'ADN et une enzyme – une nucléase – qui coupe les brins d'ADN en deux. Les premières, dites protéines à doigts de zinc, se lient spécifiquement à l'ADN au cours de la transcription génétique, le processus au cours duquel l'information codée dans la molécule d'ADN est convertie en une molécule d'ARN, à partir de laquelle la protéine codée sera synthétisée. Ces protéines présentent de petits motifs structuraux stabilisés chacun par un atome de zinc. C'est par ces motifs qu'elles reconnaissent spécifiquement une région de l'ADN. L'homme produit environ 2500 protéines à doigts de zinc différentes, et chacune d'elles se lie à une séquence nucléotidique spécifique sur la molécule d'ADN.

Couper le gène CCR5

Depuis la découverte des protéines à doigts de zinc dans les années 1980, les biologistes ont mis au point un moyen de concevoir et de fabriquer ces molécules à la demande, qui se lient spécifiquement à toute séquence d'ADN présentant un intérêt – par exemple une portion du gène CCR5. D. Ando proposa que *Sangamo BioSciences* crée un ensemble « personnalisé » de ciseaux à ADN à partir de protéines à doigts de zinc. Il s'agissait tout d'abord de produire des protéines à doigts de zinc qui s'attacheraient à chaque extrémité d'une séquence d'ADN que l'on souhaiterait supprimer. Puis, à chacune de ces protéines, on associerait une nucléase. La partie à doigts de zinc du complexe obtenu identifierait les sections de l'ADN à couper, et la nucléase couperait le matériel génétique. En mettant au point les paires adéquates de protéines à doigts de zinc, on espérait cibler uniquement la portion du gène CCR5 qui nous intéressait – sans endommager les autres gènes.

Puis la propre machinerie de réparation de la cellule prendrait la direction des opérations. Cette machinerie reconnaîtrait la coupure et réunirait les morceaux sectionnés d'ADN, supprimant quelques nucléotides ou en ajoutant d'autres. Grâce à ce processus de réparation, le gène coupé serait incapable de donner naissance à une copie fonctionnelle de la protéine CCR5. Les lymphocytes *T* ainsi modifiés seraient résistants au VIH. Multipliés grâce à nos billes magnétiques, ils seraient ensuite injectés aux patients.

MISE HORS-SERVICE DU GÈNE CCR5

La protéine CCR5, localisée à la surface des lymphocytes *T* auxiliaires, est nécessaire à l'entrée du VIH dans ces cellules. Pour rendre résistantes au VIH des personnes séropositives, une stratégie pourrait consister à mettre hors service le gène qui code cette protéine grâce à des protéines de synthèse nommées nucléases à doigts de zinc. Le domaine dit à doigts de zinc d'une telle protéine se fixe à un endroit spécifique sur le gène, tandis que le domaine enzymatique – la nucléase – coupe l'ADN. Les mécanismes de réparation prennent alors la relève, raboutant les plus longues pièces. Le gène reconstitué ne produit plus la protéine CCR5 et le VIH ne peut plus pénétrer dans les cellules ainsi modifiées.

