

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 ciblait 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 2 500 protéines à doigts de zinc différentes, et chacune d'elles se lie à une séquence nucléotidique spécifique sur la molécule d'ADN.

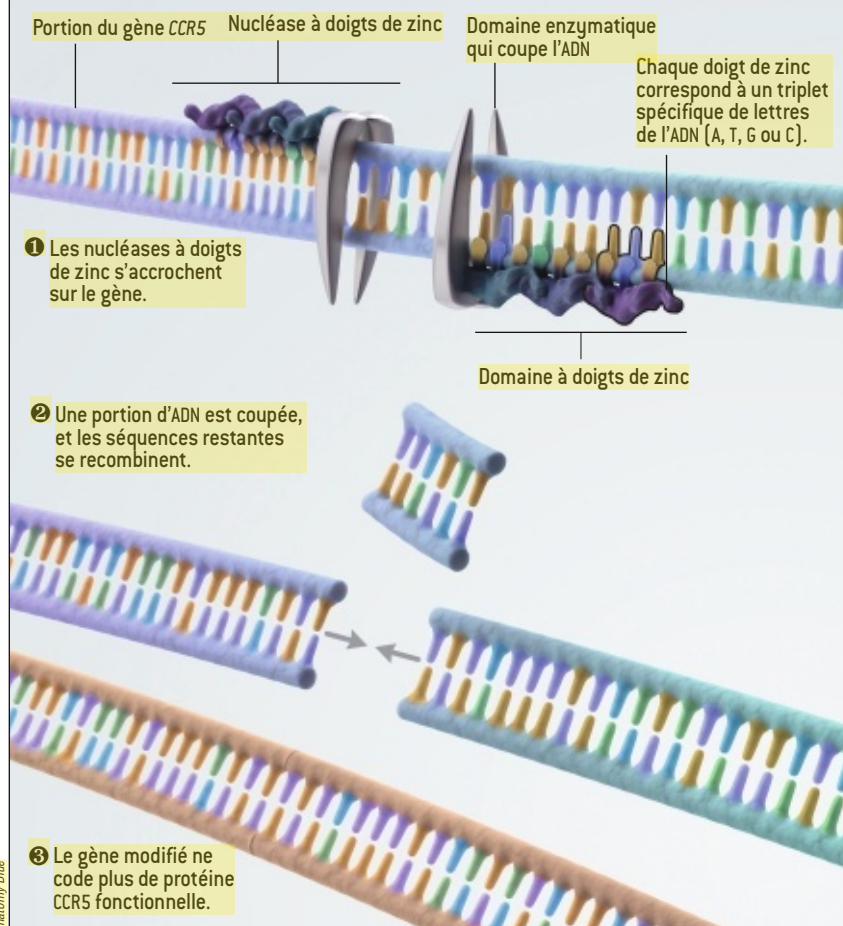
Couper le gène CCR5

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.



L'entreprise était hasardeuse, mais valait d'être tentée. Non seulement le complexe à doigts de zinc ciblait spécifiquement la protéine CCR5, mais il agissait vite et ne laissait pas de trace dans la cellule.

Nous avions déjà obtenu l'autorisation de l'Office américain du contrôle pharmaceutique et alimentaire (FDA) et de l'Institut américain de la santé pour démarrer nos études d'innocuité chez l'homme quand les nouvelles concernant le traitement du patient de Berlin éclatèrent comme une bombe. La stratégie et les résultats encourageants de l'équipe médicale allemande, dirigée par Gero Hütter, confortaient notre démarche. Pour comprendre pourquoi, retraçons son histoire. Séropositif depuis plus de dix ans, le patient se portait bien avec les médicaments antirétroviraux, jusqu'à ce qu'il développe une leucémie myéloïde aiguë, indépendante de son infection par le VIH. Il avait subi une chimiothérapie, mais le cancer était revenu. Sans une transplantation de moelle osseuse, par laquelle le système immunitaire de la personne transplantée (y compris tous les lymphocytes T) est remplacé par celui du donneur, il allait mourir.

Un patient en rémission

G. Hütter scruta les bases de données européennes de donneurs potentiels de moelle osseuse, recherchant un individu qui correspondrait aux marqueurs HLA (antigènes leucocytes humains) de son patient. Les marqueurs HLA constituent un groupe de protéines que le système immunitaire utilise pour distinguer ses propres tissus de ceux d'autres individus (le système d'histocompatibilité). Leur compatibilité entre le donneur et le receveur d'une transplantation est vitale pour empêcher les cellules transplantées de considérer le nouvel hôte comme un étranger et d'attaquer ses tissus (un phénomène appelé la réaction du greffon contre l'hôte) et pour empêcher un rejet par des composants résiduels du système immunitaire antérieur du patient.

G. Hütter ne s'arrêta pas là. Il espérait trouver quelqu'un possédant les « bons » marqueurs HLA, et dont les cellules porteraient aussi naturellement deux copies de la mutation *CCR5-Delta32*. Une transplantation de moelle osseuse d'une telle personne doterait un receveur séropositif d'un nouveau système

immunitaire qui résisterait peut-être mieux au virus.

Après avoir testé les gènes de plus de 60 donneurs potentiels, G. Hütter trouva un candidat (la recherche était compliquée par le fait que la région du génome codant les protéines HLA varie beaucoup d'un individu à l'autre et que le gène *CCR5* est situé sur un chromosome différent). Un coup de chance au regard du faible nombre de personnes présentant la mutation *CCR5-Delta32* dans les deux copies de leur gène *CCR5*. Heureusement, le patient de Berlin avait un système HLA très courant. Pour donner une idée de la rareté de cette combinaison, les chercheurs du

JUSQU'À PRÉSENT, LES MÉDECINS

n'ont détecté aucune trace du VIH chez le patient de Berlin, et ce, en utilisant les tests moléculaires les plus sensibles disponibles.

monde entier ont essayé de reproduire l'expérience allemande et n'ont encore trouvé aucun individu présentant le bon ensemble de marqueurs HLA et de mutations de *CCR5*.

Le patient a eu besoin de deux transplantations de moelle osseuse du donneur pour guérir de sa leucémie. À l'heure où nous imprimons, plus de cinq ans après l'opération et malgré l'absence de thérapie par médicaments antirétroviraux, les médecins n'ont détecté aucune trace de VIH dans son sang, son foie, ses intestins, son cerveau, ses tissus lymphatiques ou son plasma, et ce, en utilisant les tests moléculaires les plus sensibles disponibles.

Personne ne sait si le VIH a vraiment été éradiqué de tous les tissus de l'organisme du patient. Le VIH a la capacité d'insérer ses gènes dans les chromosomes de diverses cellules, ce qui lui permet de demeurer à l'état dormant pendant de nombreuses années, puis de ressurgir lors d'une infection (voir l'article de Ch. Rouzioux, A. Chéret et V. Avettand-Fénoël, page 42). A-t-il été éliminé de ces cellules chez le patient de Berlin, ce qui correspondrait à une guérison « de stérilisation » ? Ou en reste-t-il, mais son système immunitaire est suffisamment performant à présent pour repousser toute réapparition de l'infection ? Dans ce cas, le patient de Berlin serait « fonctionnellement » guéri. Quoi qu'il en soit, il n'a plus à prendre de médicaments antirétroviraux et semble débarrassé de

✓ BIBLIOGRAPHIE

P. Cannon et C. June, **Chemokine receptor 5 knockout strategies**, *Current Opinions in HIV and AIDS*, vol. 6, n° 1, pp. 74-79, 2011.

T. Rosenberg, **The man who had HIV and now does not**, *New York Magazine*, 29 mai 2011.

E. E. Perez et al., **Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases**, *Nature Biotechnology*, vol. 26, pp. 808-816, 2008.

Le sida, 25 ans après. Les grands défis, *Pour la Science*, n° 377, pp. 38-57, 2008.

S. O'Brien et M. Dean, **Pourquoi certaines personnes résistent au sida**, *Pour la Science*, n° 240, pp. 82-89, 1997.