

La thérapie génique, promesses et limites

THEODORE FRIEDMANN

Les biologistes modifient des virus et fabriquent des agrégats moléculaires pour introduire des gènes dans les cellules de personnes malades.

A la fin du XIX^e siècle, les associés de l'architecte Daniel Burnham le regardaient avec scepticisme dessiner les plans de quelques-uns des premiers gratte-ciel modernes. Inversement, Burnham leur enjoignait d'avoir «des plans d'envergure, pleins d'une magie capable d'émouvoir l'imagination humaine». Il les incitait à dépasser les limites traditionnelles de l'architecture, à imaginer des projets entièrement nouveaux, à réaliser des exploits impensables auparavant.

Depuis quelques siècles, la médecine est aussi bouleversée sans cesse : elle s'est enrichie de l'utilisation du microscope, de l'anesthésie, de la vaccination, des antibiotiques, des transplantations... Elle s'apprête à passer un autre cap : bientôt, nous soignerons de nombreuses maladies, héréditaires ou non, en insérant des gènes dans les cellules des malades.

Quelques chercheurs trop enthousiastes, des industriels et des journalistes ont laissé croire que les applications cliniques de la thérapie génique étaient au point : c'est exagéré. Les fondements théoriques de la thérapie génique sont connus, et chaque fois qu'un nouveau gène est découvert, les biologistes cherchent s'il peut être utilisé pour soigner une maladie. En revanche, bien que l'on sache faire fonctionner des gènes transférés dans l'organisme humain et que l'on améliore ainsi la santé des patients, on n'a pas encore prouvé l'efficacité à long terme d'un traitement par thérapie génique.

Le manque de résultats cliniques spectaculaires est dû en grande partie aux tâtonnements initiaux, comme il y en a chaque fois que l'on met au

point une nouvelle technique, et aussi à des obstacles plus importants que ceux que nous avons prévus. L'absence d'efficacité des premiers traitements incite à la modestie, mais elle ne remet pas en question les promesses de la thérapie génique : les essais cliniques sur des malades ont commencé il y a à peine dix ans.

Comment insérer des gènes étrangers dans des cellules et les rendre fonctionnels ? Les biologistes utilisent le plus souvent des virus, parce que ceux-ci, naturellement, infectent les cellules en y insérant leurs propres gènes. En les modifiant, on veut éviter leurs effets pathogènes et leur donner une action thérapeutique adaptée aux différentes pathologies.

Nous n'examinerons ici que les thérapies relatives aux cellules somatiques, c'est-à-dire ne concernant ni les spermatozoïdes ni les ovocytes : jusqu'à présent, les chercheurs en thérapie génique se sont interdit de modifier la descendance des personnes traitées. Toutefois, depuis le clonage récent d'une brebis adulte, un débat public clarificateur sur les bienfaits et les risques d'une thérapie des cellules germinales devient urgent.

ADN, ARN et protéines

Avant d'examiner les obstacles à la mise en œuvre de la thérapie génique, examinons comment les gènes participent à la synthèse des protéines. Une protéine est une molécule formée d'un enchaînement d'acides aminés. Les gènes, qui codent les protéines, sont également des molécules formées par l'enchaînement de petites molécules

nommées bases : un groupe de trois bases successives code un acide aminé. Le passage de l'ADN à la protéine s'effectue indirectement : d'abord l'ADN est recopié sous la forme d'ARN messager, puis les organites intracellulaires nommés ribosomes synthétisent la protéine à partir de l'ARN, en traduisant les groupes de trois bases en acides aminés qui s'enchaînent successivement. Les gènes, pour y revenir, sont rassemblés en chromosomes, dans le noyau des cellules. Toutes les cellules d'un même organisme contiennent les mêmes gènes, mais toutes ne les utilisent pas tous. Ainsi, les cellules du foie se comportent différemment des neurones, parce qu'elles fabriquent des ensembles de protéines différents, en utilisant («exprimant») différents sous-ensembles de gènes : dans chaque cellule, seuls certains gènes sont transcrits en ARN messager.

Quand une mutation touche un gène particulier, la protéine correspondante peut ne pas être fabriquée, fonctionner au ralenti ou, au contraire, être trop active. Ce défaut de fabrication peut perturber les fonctions vitales des cellules et des tissus qui utilisent la protéine produite par le gène anormal, et déclencher les symptômes d'une maladie.

Classiquement, les médecins traitent les maladies dues à des mutations génétiques héréditaires en intervenant sur les conséquences biologiques de ces mutations. Par exemple, contre la phénylcétonurie (une accumulation toxique de produits du métabolisme de l'acide aminé phénylalanine, due à l'absence d'un gène), on a longtemps prescrit un régime alimentaire qui réduit l'absorption de la phénylala-

nine. Toutefois, ces interventions non génétiques sont peu efficaces.

Comment remédier à la cause initiale de telles maladies? L'inefficacité des autres thérapeutiques, une meilleure compréhension du fonctionnement des gènes et la découverte des gènes responsables d'un grand nombre de maladies héréditaires ont mis les médecins sur la voie de remèdes définitifs, au début des années 1970. Puis on a découvert que même des maladies acquises avaient une composante génétique, qu'il est théoriquement possible de corriger. Ainsi des traitements sont expérimentés contre des maladies héréditaires, telles la mucoviscidose (maladie des poumons), la myopathie, la déficience en adénosine désaminase (qui altère gravement le système immunitaire), l'hypercholestérolémie familiale (qui conduit à l'apparition précoce d'une artériosclérose grave) et, surtout, contre des cancers. Dans la plupart des cas, ces derniers ne sont pas héréditaires, mais résultent d'une accumulation d'altéra-

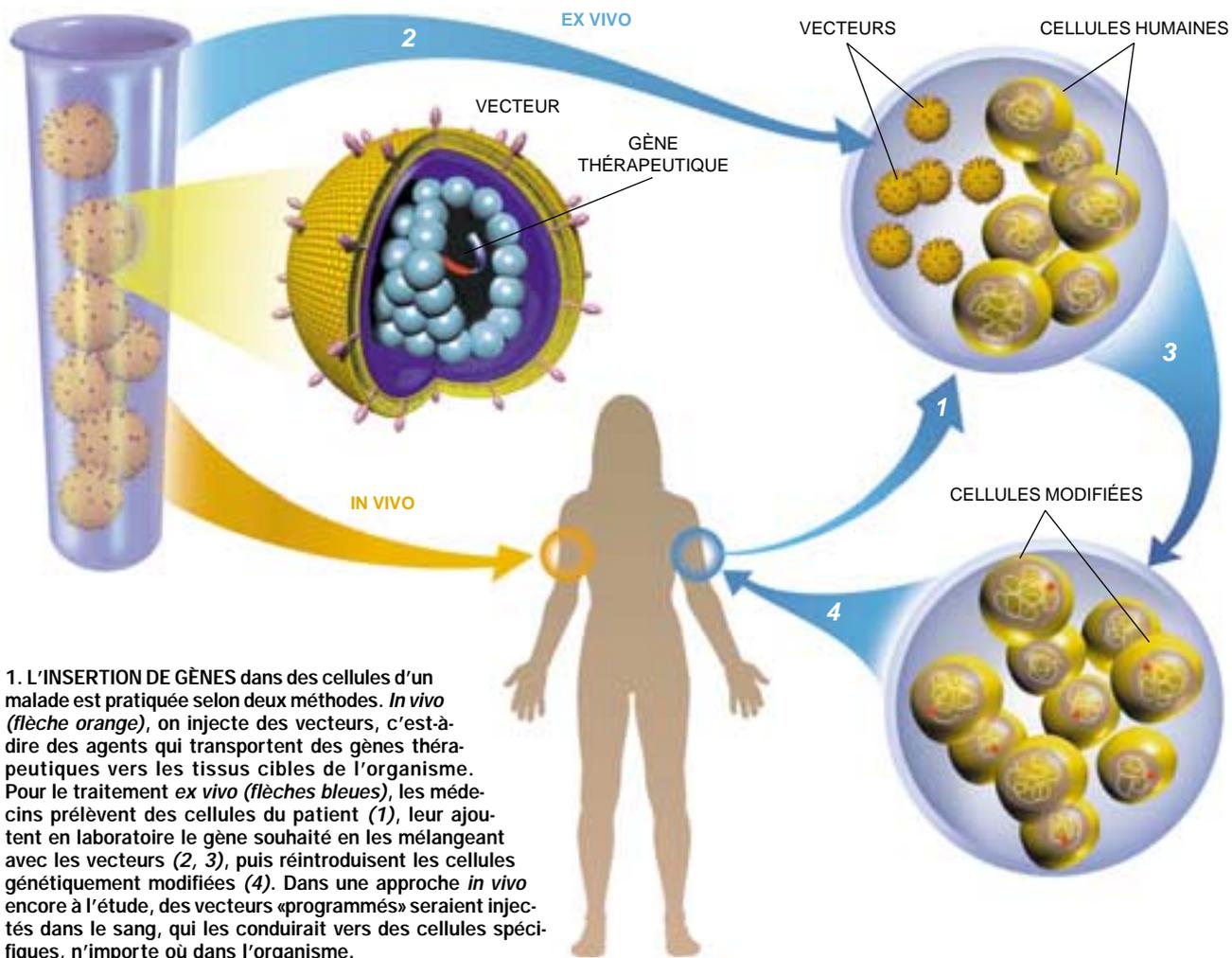
tions génétiques se produisant après la naissance. Un certain nombre d'essais concernent aussi le SIDA, causé par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

En principe, on peut remplacer physiquement un gène défectueux d'un chromosome par un gène normal. En pratique, une insertion aussi précise n'est pas encore réalisable chez l'homme... mais elle n'est pas non plus indispensable : dans la plupart des traitements par thérapie génique, on ajoute seulement un gène utile dans un certain type de cellules, afin de pallier l'inefficacité du gène présent ou d'introduire une propriété nouvelle. Bien des thérapies géniques anticancéreuses étudiées aujourd'hui suivent ce principe : elles visent à faire fabriquer, par les cellules cancéreuses, des substances qui les tueront directement, déclencheront une réaction immunitaire ou bloqueront l'irrigation sanguine des tumeurs, les empêchant ainsi de croître.

D'autre part, quelques équipes tentent d'empêcher la synthèse ou l'action de protéines nuisibles, produites par un gène défectueux. Une première approche est celle des ADN antisens : à l'aide de courtes séquences d'ADN synthétique, on empêche les segments d'ARN messager de gènes mutants de synthétiser des protéines. Des procédés voisins utilisent de petites molécules d'ARN, nommées ribozymes, pour dégrader l'ARN messager provenant de gènes anormaux. Enfin, on tente d'utiliser des hybrides d'ADN et d'ARN afin de réparer des gènes mutants. Une autre méthode consiste à insérer le gène d'une protéine nommée anticorps intracellulaire, qui bloque l'activité de la protéine mutante.

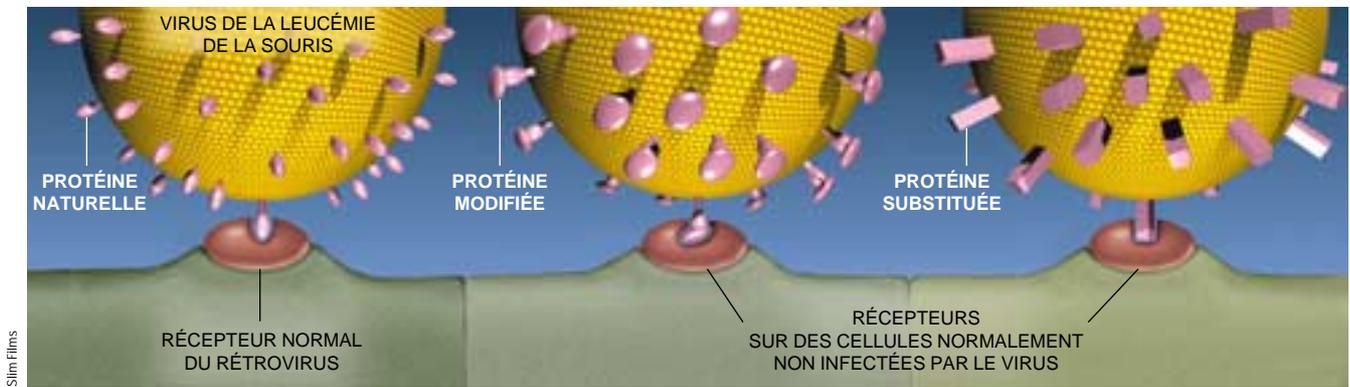
Des cellules modifiées

On utilise aujourd'hui deux méthodes d'introduction des gènes chez des malades. Dans les deux cas, les gènes sont d'abord introduits dans des



1. L'INSERTION DE GÈNES dans des cellules d'un malade est pratiquée selon deux méthodes. *In vivo* (flèche orange), on injecte des vecteurs, c'est-à-dire des agents qui transportent des gènes thérapeutiques vers les tissus cibles de l'organisme. Pour le traitement *ex vivo* (flèches bleues), les médecins prélèvent des cellules du patient (1), leur ajoutent en laboratoire le gène souhaité en les mélangeant avec les vecteurs (2, 3), puis réintroduisent les cellules génétiquement modifiées (4). Dans une approche *in vivo* encore à l'étude, des vecteurs «programmés» seraient injectés dans le sang, qui les conduirait vers des cellules spécifiques, n'importe où dans l'organisme.

Slim Films



2. POUR ENTRER DANS UNE CELLULE, un virus doit s'associer à des molécules de surface particulières, ou récepteurs. Le virus de la leucémie de la souris se lie normalement, par l'intermédiaire d'une protéine de son enveloppe, à un récepteur présent chez de nombreux types de cellules (à gauche). En modifiant cette protéine

pour y inclure de nouveaux éléments (au centre) ou en la remplaçant par d'autres protéines (à droite), on dirige le virus vers des cellules qu'il n'infecte normalement pas. Des manipulations semblables permettent à d'autres vecteurs de cibler d'autres types de cellules spécifiques.

vecteurs, qui acheminent les gènes jusque dans les cellules. Dans la méthode *ex vivo*, la plus employée, des cellules sont extraites du tissu à traiter et mises en présence de vecteurs de transfert de gènes ; puis les cellules génétiquement corrigées sont réintroduites chez le patient. Dans le procédé *in vivo*, les vecteurs sont introduits directement dans l'organisme, en général dans le tissu à traiter. Idéalement, on préférerait introduire les vecteurs dans le sang ou dans d'autres sites, d'où ils se dirigeraient d'eux-mêmes vers les cellules ciblées, notamment vers des organes difficiles à atteindre ou vers des zones cancéreuses cachées. Des vecteurs capables de s'orienter ainsi dans le corps humain n'existent pas encore, mais les travaux avancent rapidement.

Dans l'organisme, certains gènes n'ont un effet bénéfique que si leur expression est rigoureusement régulée : ils doivent produire, aux bons moments, l'exacte quantité de protéines nécessaire. Les biologistes ne maîtrisent pas encore à ce point l'expression des gènes étrangers introduits dans l'organisme, mais cela n'est pas gênant pour de nombreuses applications de la thérapie génique. D'autre part, on peut souvent se contenter d'introduire les gènes dans d'autres cellules que les cellules malades. Certaines cellules plus accessibles, telles celles des muscles ou de la peau, sont en effet quelquefois utilisables comme usines à protéines : elles fabriquent les molécules nécessaires, et les transmettent à des cellules voisines ou les libèrent dans le sang, qui les achemine alors vers des organes éloignés.

Quel type de vecteur peut transporter et distribuer les gènes efficacement et sans danger ? L'idée d'utiliser des virus remonte aux origines de la thérapie génique. Les virus sont à peine plus que des gènes capables de se répliquer, entourés d'une enveloppe protéique. L'évolution les a progressivement rendus capables d'entrer dans des cellules et d'y exprimer leurs gènes. Les biologistes savent substituer un ou plusieurs gènes à potentialités thérapeutiques à des gènes de réplication virale ou de virulence. Théoriquement, un virus que l'on a ainsi modifié pour le rendre inoffensif transférerait des gènes bénéfiques dans des cellules sans se reproduire ni provoquer de maladie.

Les virus les plus étudiés sont les rétrovirus, qui insèrent des copies de leurs gènes dans les chromosomes des cellules qu'ils envahissent. Les gènes ainsi intégrés sont ensuite copiés et transmis à toute la descendance de ces cellules. Beaucoup d'autres types de virus n'intègrent pas leur matériel génétique dans les chromosomes des cellules qu'ils infectent. En général, leurs gènes ne sont que temporairement actifs dans l'organisme, notamment parce que ces gènes ne se répliquent pas lorsque les cellules infectées se divisent.

Les cellules souches sont des cibles idéales pour les vecteurs rétroviraux, car ces cellules souches vivent indéfiniment et engendrent des cellules plus spécialisées. Les cellules souches du sang, par exemple, donnent naissance aux différents types de cellules sanguines (globules rouges, globules blancs du système immunitaire...) et peuvent reconstituer le sang ; en outre, elles se reproduisent à l'identique. Aujourd'hui,

toutefois, on identifie difficilement les cellules souches humaines et l'on ne sait pas encore les modifier de façon à la fois prévisible et sûre.

Des rétrovirus modifiés

Les rétrovirus, testés comme vecteurs depuis le début des années 1980, ont de nombreux inconvénients. Tout d'abord, ils sont peu sélectifs : ils déposent leurs gènes dans les chromosomes de cellules variées. De ce fait, l'incorporation de gènes étrangers dans des cellules auxquelles ils n'étaient pas destinés réduit l'impact sur les cellules visées et risque de produire des effets physiologiques indésirables. Toutefois, les rétrovirus ou les autres virus n'apportent leur matériel génétique dans une cellule que si les protéines fixées à leur surface rencontrent des éléments correspondants, ou récepteurs, sur cette cellule. La liaison des protéines virales et des récepteurs cellulaires provoque la fusion de l'enveloppe du rétrovirus avec la membrane cellulaire, et la libération des protéines et des gènes viraux à l'intérieur de la cellule. On tente donc d'accroître la sélectivité des rétrovirus envers les cellules qu'ils envahissent par le remplacement ou la modification des protéines de leur surface, ou par l'ajout à celle-ci de nouvelles protéines ou parties de protéines.

Ainsi, mon collègue Jiing-Kuan Yee a modifié le virus de la leucémie de la souris, remplaçant la protéine de surface par celle du virus de la stomatite vésiculaire humaine (une infection de la bouche). Le virus de la souris, apparemment inoffensif pour l'homme, est le rétrovirus le plus étudié comme vec-

teur de thérapie génique. Ainsi modifié, il a pénétré dans des cellules qui portaient des récepteurs du virus de la stomatite vésiculaire humaine et n'a pas infecté des cellules qui portaient des récepteurs du virus de la leucémie. Yuet Wai Kan et ses collègues de l'Université de San Francisco ont récemment lié une hormone aux protéines de l'enveloppe du même virus de la leucémie, permettant ainsi à celui-ci d'infecter spécifiquement des cellules humaines porteuses du récepteur de l'hormone.

Les rétrovirus ont un autre défaut : ils ne propagent leurs gènes que lors des divisions cellulaires, lorsque la membrane entourant le noyau de la cellule infectée disparaît. Ils ne peuvent donc pas modifier les cellules

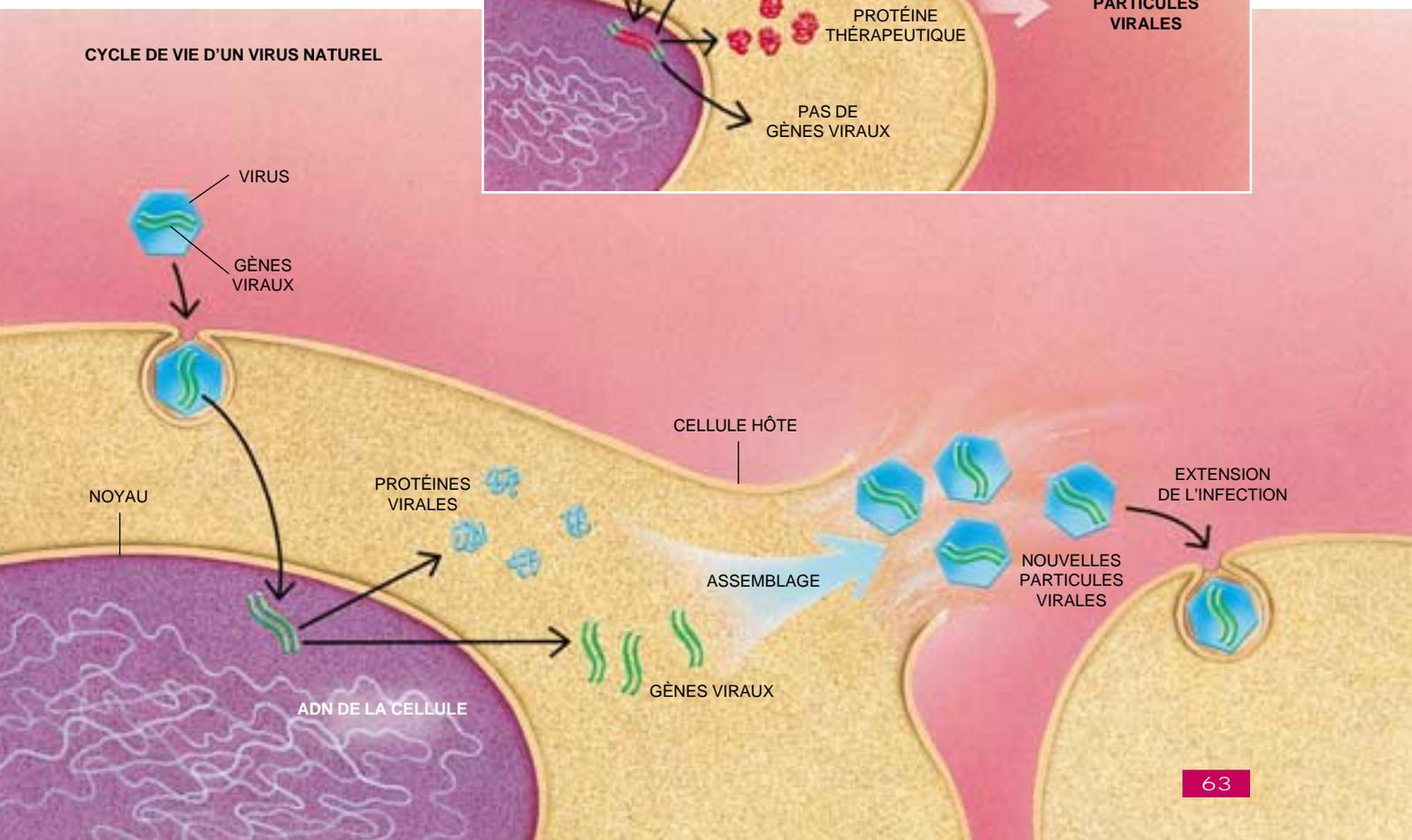
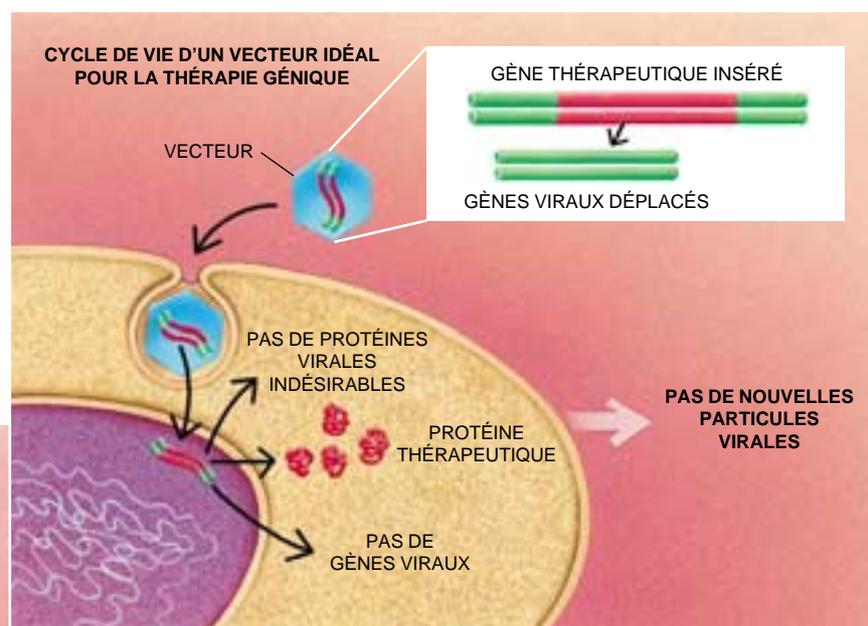
qui ne se divisent pas, ou qui ne le font que rarement (tels les neurones à l'état mature et les cellules des muscles).

Afin de pallier cette difficulté, Inder Verma, Didier Trono et leurs collègues de l'Institut Salk ont utilisé le VIH, qui introduit ses gènes dans le noyau des neurones, sans attendre que l'enveloppe nucléaire disparaisse au cours d'une division cellulaire. Les biologistes ont extrait les gènes qui permettraient au VIH de se reproduire et leur ont substitué un gène qui code une protéine facile à détecter. Le gène marqué a été introduit dans des neurones, qui ne se divisent pas, d'abord par simple mélange du vecteur viral et de cellules en culture, puis par injection directe du vecteur dans le cerveau de rats. Le VIH

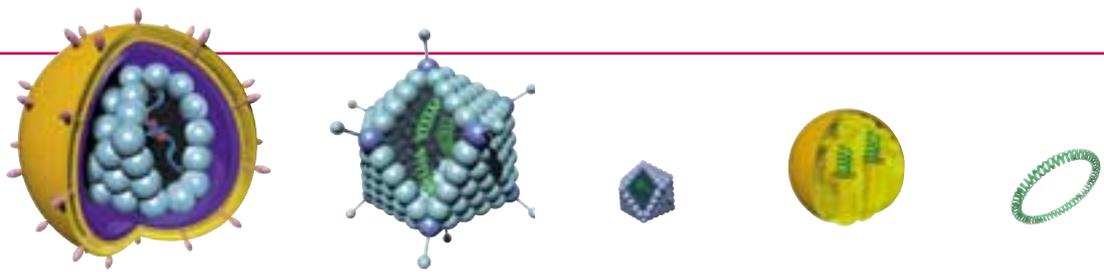
pourra être utilisé comme vecteur chez l'homme quand nous serons certains qu'ainsi désactivé il ne redeviendra pas pathogène, mais on pourrait aussi transférer dans des rétrovirus inoffensifs pour l'homme certains des gènes du VIH, tels ceux qui codent les protéines transportant les gènes jusqu'au noyau.

Enfin, on cherche à éviter que les rétrovirus n'insèrent les gènes au hasard dans les chromosomes de l'hôte : selon le lieu d'insertion, d'autres gènes peuvent être cassés ou modifiés. Le risque de cancer dû à ces ruptures, bien que faible, existe. L'étude de l'intégration des gènes étrangers dans des levures, par exemple, semble indiquer progressivement des moyens de mieux guider cette intégration.

3. UN VIRUS NATUREL (*en bas*) libère ses gènes dans la cellule qu'il infecte. Que les gènes soient ou non intégrés à l'ADN cellulaire, ils déclenchent la synthèse de nouvelles particules virales, qui peuvent endommager la cellule et en infecter d'autres. Pour transformer un virus naturel en un inoffensif vecteur de thérapie génique, les biologistes remplacent des gènes viraux par des gènes qui codent des protéines thérapeutiques (*en haut*) et ne gardent que les éléments viraux indispensables à l'expression des gènes. Ces vecteurs pénètrent dans les cellules et permettent la synthèse de protéines thérapeutiques, mais ne se reproduisent pas.



Tomo Narashima



	Rétrovirus	Adénovirus	Virus associés aux adénovirus	Liposomes	ADN nu
Avantages potentiels	Intègrent les gènes dans les chromosomes hôtes avec une stabilité à long terme.	La plupart ne provoquent pas de maladies graves ; grande capacité pour les gènes étrangers.	Intègrent les gènes dans les chromosomes hôtes ; n'entraînent pas de maladie connue.	Dépourvus de gènes viraux, ils ne provoquent pas de maladie.	Avantages identiques à ceux des liposomes ; sans doute utile pour la vaccination.
Inconvénients actuels	Intégration aléatoire des gènes : risquent d'endommager des gènes hôtes. Beaucoup d'entre eux n'infectent que des cellules en cours de division.	Les gènes peuvent n'être actifs que transitoirement, soit par défaut d'intégration, soit par réaction du système immunitaire.	Faible capacité pour les gènes étrangers.	Moins efficaces que les virus pour transférer les gènes aux cellules.	Inefficace pour le transfert de gènes ; instable dans la plupart des tissus de l'organisme.

Slim Films

4. LES VECTEURS VIRAUX et non viraux à l'étude ont chacun des avantages et des inconvénients, qui les rendent plus ou moins adaptés au traitement de différentes maladies.

Du rhume à la thérapie génique

D'autres virus que les rétrovirus ont d'autres avantages, et aussi d'autres inconvénients. Les plus fréquemment utilisés, après les rétrovirus, sont les adénovirus humains, car ils sont parfaitement inoffensifs : chez des personnes en bonne santé, ils n'entraînent normalement que des rhumes. De plus, ils infectent facilement les cellules humaines et conduisent à la synthèse de quantités importantes de la protéine thérapeutique, pendant quelque temps après l'infection.

Les adénovirus transportent les gènes jusqu'au noyau, mais, apparemment, ne les insèrent pas dans des chromosomes : on évite ainsi le risque de dégradation de gènes cellulaires essentiels et de cancer. Souvent, toutefois, ces gènes n'ont qu'une activité temporaire. Comme l'ADN finit par disparaître, les traitements de maladies chroniques, telle la mucoviscidose, doivent être renouvelés mensuellement ou annuellement. Cet inconvénient devient parfois un avantage : pour déclencher temporairement une réaction immunitaire contre un cancer ou un agent pathogène, une brève activité du gène étranger est préférable.

Les adénovirus ont le même manque de sélectivité que les rétrovirus ; les mêmes types de solutions

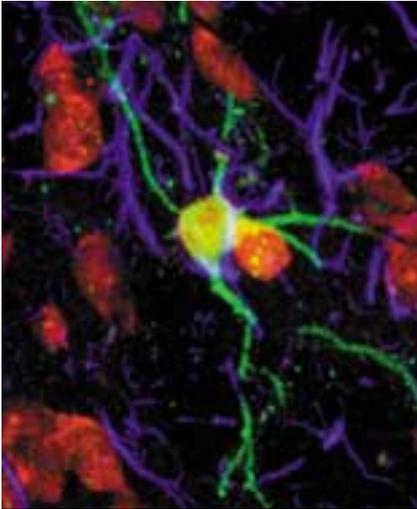
sont actuellement testés. Aujourd'hui, l'obstacle le plus sérieux à l'utilisation des adénovirus comme vecteurs chez des malades est la réaction immunitaire énergique qu'ils provoquent. Au cours d'un premier traitement, ces vecteurs atteignent les cellules souhaitées et déclenchent la fabrication de grandes quantités des protéines désirées. Cependant les défenses de l'hôte tuent rapidement les cellules modifiées et inactivent leurs nouveaux gènes. Si les virus sont administrés une seconde fois, le système immunitaire les élimine encore plus rapidement. Ces réactions sont probablement responsables de la disparition de l'expression des gènes, observée dans de nombreuses études cliniques de transfert de gènes par des adénovirus. On cherche aujourd'hui à réduire la réaction immunitaire en enlevant ou en modifiant les gènes viraux qui en étaient les principaux responsables.

D'autres virus pourraient servir de vecteurs : les virus associés aux adénovirus, les herpesvirus, les alphavirus et les poxvirus. Aucun n'est idéal, mais chacun aurait des applications spécifiques. Les virus associés aux adénovirus sont inoffensifs pour l'homme, et ils intègrent naturellement leurs gènes dans les chromosomes humains : ils pourraient remplacer les rétrovirus, avec la réserve que, plus petits, ils ne pour-

raient introduire des gènes de grande taille. Les herpesvirus n'intègrent pas leurs gènes dans l'ADN de leurs hôtes, mais ils sont attirés vers les neurones, dont certains les maintiennent dans un état à peu près inoffensif pendant la durée de vie de la personne atteinte : ils seraient de bons vecteurs pour traiter des maladies neurologiques.

Les virus ne sont pas les seuls vecteurs potentiels. On fabrique des agents synthétiques en combinant de l'ADN avec des molécules qui le condensent, le transportent vers les cellules et, à l'intérieur de celles-ci, le protègent des dégradations. Comme celle des virus, leur utilisation thérapeutique requiert encore des perfectionnements. Les gènes transportés par des vecteurs non viraux s'intègrent bien aux chromosomes des cellules hôtes en laboratoire, mais mal dans l'organisme. Comme nous l'avons déjà vu, ce défaut d'intégration peut être un avantage ou un inconvénient, selon l'objectif de chaque thérapie.

Les liposomes, de petites sphères composées de molécules de graisses analogues à celles des parois cellulaires (des lipides) sont étudiés depuis presque aussi longtemps que les rétrovirus. On sait y loger un plasmide, boucle stable d'ADN provenant de virus des bactéries nommés bactériophages, dont les gènes d'origine ont été remplacés par ceux dont on attend un effet



5. CE NEURONE HUMAIN a absorbé un vecteur viral construit à partir du virus du SIDA : on a éliminé les éléments les plus dangereux et ajouté un gène qui code une protéine repérable (*en jaune*). Des formes inactivées d'un rétrovirus tel que le VIH pourraient introduire des gènes thérapeutiques dans des neurones, dont l'incapacité à se diviser les rend résistants aux autres rétrovirus.

thérapeutique. Le transfert de gènes par des liposomes est bien moins efficace que celui effectué par les virus, mais sa mise au point est suffisamment avancée pour que ces vecteurs abordent la phase des essais cliniques contre certaines affections, tels le cancer et la mucoviscidose. Des modifications de la composition chimique des liposomes améliorent leur sélectivité et leur efficacité dans le transfert de gènes.

L'ADN peut aussi être transporté par des agrégats de molécules variées, tels les peptides (des enchaînements de quelques acides aminés), qui se lient à des cellules cibles et bloquent sa dégradation par les enzymes cellulaires. Ces «complexes» donnent de bons résultats *in vitro* ; on les modifie afin de les tester sur des animaux et chez des patients.

L'injection d'ADN nu donne également d'intéressantes possibilités d'immunisation contre les maladies infectieuses, voire contre certaines formes de cancers. Et d'autres formes d'ADN que les plasmides sont également à l'étude : les biologistes essaient notamment de construire des chromosomes miniatures, où ils inséreraient des gènes thérapeutiques. Ces assemblages contiendront juste la quantité de matériel génétique nécessaire pour éviter sa dégradation dans le noyau et sa disparition au cours de la division cellulaire. Ils contiendront aussi

des éléments leur permettant de se répliquer fidèlement (et une seule fois) à chaque division cellulaire, comme un vrai chromosome.

Lorsqu'ils seront au point, les différents types de vecteurs seront utilisés pour des traitements différents. Si une personne porteuse d'une anomalie génétique a besoin de recevoir pendant toute sa vie le produit du gène normal, on préférera un vecteur qui insérera de façon permanente le gène thérapeutique dans ses chromosomes : un rétrovirus ou un virus associé aux adénovirus. Pour une activité à court terme, par exemple pour provoquer une réaction immunitaire contre des cellules cancéreuses ou contre un agent infectieux, on emploiera des vecteurs qui n'insèrent pas leurs chromosomes, tels des adénovirus, des liposomes ou de l'ADN nu. Les vecteurs que nous utiliserons demain ne ressembleront toutefois que de loin aux prototypes que nous testons aujourd'hui.

La mise au point de vecteurs n'est pas la seule réalisation nécessaire à la thérapie génique. Les biologistes devront éviter l'inactivation des gènes étrangers par les cellules où ils sont introduits, et limiter la réaction immunitaire contre des protéines apparemment étrangères. Pour empêcher toute réaction immunitaire inactivante, les médecins pourraient administrer des substances antirejet à certains malades ou obtenir une tolérance immunitaire à l'égard de la protéine en entreprenant une thérapie génique très tôt dans la vie du malade, avant que le système immunitaire ne soit devenu opérationnel.

Theodore FRIEDMANN dirige le programme de thérapie génique et est professeur de pédiatrie et d'éthique biomédicale à l'Université de San Diego.

I. VERMA, *La thérapie génique*, *Pour la Science*, janvier 1991.

M. PERRICAUDET, L. SCHAFFAR et T. TURZ, *La thérapie génique par adénovirus*, *Pour la Science*, octobre 1994.

M.K. BRENNER, *Human Somatic Gene Therapy : Progress and Problems*, in *Journal of Internal Medicine*, vol. 237, n° 3, pp. 229-239, mars 1995.

Recombinant DNA Research, Agency : National Institutes of Health, *Federal Register*, vol. 61, n° 131, pp. 35774-35777, lundi 8 juillet 1996.
