

Les vecteurs non viraux de thérapie génique

Jean-Yves Legendre
Jean Haensler
Jean-Serge Remy

Plusieurs systèmes sont en cours d'étude pour le transfert ciblé de gènes. A côté des systèmes viraux, des systèmes purement chimiques sont développés : transfert par des liposomes, condensation de l'ADN sur des lipides cationiques, des polymères ou des peptides, injection directe de l'ADN nu dans l'organe ciblé. Les systèmes non viraux actuels sont mal adaptés à l'injection par voie générale. En revanche, ils restent très attrayants pour les traitements par voie locale : traitement des artères, aérosol pour traitement pulmonaire, injection intratumorale. Le quart environ des essais cliniques actuels de thérapie génique font appel à des transferts non viraux de gènes, mais nombreux sont les problèmes encore non résolus, en particulier la biodisponibilité, l'efficacité de transfection et la durée d'expression des transgènes. Rappelons par ailleurs que l'injection intramusculaire directe de l'ADN plasmidique semble être une voie majeure de développement des vaccins futurs.

La thérapie génique consiste à considérer un gène comme un médicament qu'il s'agisse de remplacer la fonction d'un gène défectueux ou de commander la synthèse dans l'organisme d'une protéine thérapeutique quelconque. Par extension, la thérapie génique est également considérée comme l'administration à un patient d'ADN (ou d'ARN) dans un but préventif, curatif ou diagnostique [1, 2]. Ce concept est désormais devenu une réalité et environ 150 protocoles cliniques incluant plus de 1 000 patients sont actuellement en cours dans le monde [2, 3]. Toutefois, malgré certains résultats encourageants, de nombreux obstacles restent à franchir avant une

éventuelle utilisation thérapeutique de cette technologie. En effet, le niveau d'expression du gène *in vivo* reste très faible, la restauration génétique ou biologique, quand elle existe, est transitoire et incomplète [2, 3].

L'un des aspects essentiels du transfert de gènes à visée thérapeutique est la vectorisation de l'ADN par un transporteur jusqu'à la cellule cible. En effet, l'ADN est une molécule anionique, hydrophile et de masse moléculaire très élevée (par exemple, 3 millions pour un plasmide de 5 kb) et n'est donc pas une molécule propice au passage des membranes biologiques. C'est pourquoi, dans la plupart des cas, l'ADN doit être introduit dans la cellule, soit à l'aide

ADRESSE

J.Y. Legendre : *docteur en pharmacie, docteur ès sciences, R et D pharmaceutique*. Laboratoire UPSA, 128, rue Danton, 92506 Rueil-Malmaison, France. J. Haensler : *docteur ès sciences*. Département formulation, Pasteur-Mérieux, Sérums et Vaccins, Marcy-L'Étoile, France. J.S. Remy : *docteur ès sciences, chargé de recherche*. Cnrs, Laboratoire de chimie bio-organique, Faculté de pharmacie, Illkirch, France.

RÉFÉRENCES

1. Friedmann T. Progress toward human gene therapy. *Science* 1989; 244: 1275-81.
2. Kahn A. Thérapie génique: le temps d'un premier bilan. *médecine/sciences* 1996; 12: 9-12.
3. Valère T. Thérapie génique: le point sur les essais cliniques. *médecine/sciences* 1996; 12: 73-83.
4. Morgan JR, Tompkins RG, Yarmush ML. Advances in recombinant retroviruses for gene delivery. *Adv Drug Del Rev* 1993; 12: 143-58.
5. Ali M, Lemoine NR, Ring CJA. The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Ther* 1994; 1: 367-84.
6. Knowles MR, Hohneker KW, Zhou Z, Olsen JC, Noah TL, et al. A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1995; 333: 823-31.
7. Crystal RG. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 1995; 270: 404-10.
8. Ledley FD. Non-viral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 1129-44.
9. Tomlinson E, Rolland A. Controllable gene therapy: pharmaceuticals of non-viral gene delivery systems. *J Control Rel* 1996; 39: 357-72.
10. Legendre JY, Szoka FC. Liposomes for gene therapy. In: Puisieux F, Couvreur P, Delattre J, Devissaguet JP, eds. *Liposomes: new systems and new trends in their applications*. Paris: Editions de Santé, 1995: 667-92.
11. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection, a highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7413-7.
12. Behr JP, Demeinex B, Loeffler JP, Perez-Mutul J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6982-6.
13. Behr JP. L'éponge à protons: un moyen d'entrer dans une cellule auquel les virus n'ont pas pensé. *médecine/sciences* 1996; 12: 56-9.
14. Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995; 270: 18997-9007.
15. Behr JP. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjugate Chem* 1994; 5: 382-9.

d'une technique physique ou chimique fragilisant les membranes cellulaires, soit combiné à un vecteur. Deux types de vecteurs d'ADN sont actuellement utilisés: les vecteurs viraux et les vecteurs synthétiques, non viraux. Quel que soit le transporteur utilisé, les particules contenant l'ADN doivent successivement (figure 1): (1) s'associer aux cellules, de manière spécifique ou non; (2) pénétrer dans le cytoplasme de la cellule, soit par fusion directe avec la membrane plasmique, soit après rupture de vésicules intracellulaires (endosomes, lysosomes), (3) permettre l'entrée de l'ADN dans le noyau de la cellule.

Les virus, au cours de l'évolution, ont appris à surmonter les différentes barrières cellulaires et à transférer leur matériel génétique à l'intérieur des cellules mammifères. Il est, de ce fait, tout naturel que les chercheurs se soient tournés très tôt vers les virus comme vecteurs de gènes exogènes [4, 5]. Les rétrovirus et les adénovirus constituent actuellement les vecteurs de choix et représentent environ 75 % des essais cliniques en cours. Malgré certains succès, les vecteurs viraux n'ont pas répondu à toutes les attentes et des effets toxiques de type inflammatoire ou immunogène se sont manifestés lors de protocoles cliniques [6, 7]. De plus, la difficulté de produire des virus à des titres élevés et d'insérer des gènes de grande taille dans les génomes viraux se pose de manière aiguë [7]. Pour ces différentes raisons et parallèlement à la mise au point de nouveaux vecteurs viraux, le développement de vecteurs synthétiques à base d'ADN plasmidique, faiblement toxiques et de composition parfaitement connue est souhaitable [8, 9].

Les différents types de vecteurs

• Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules lipidiques qui peuvent encapsuler et véhiculer divers principes actifs et qui sont développés depuis 25 ans comme vecteurs de médicaments et en cosmétologie. Du fait de leur faible toxicité et de leur propriété d'encapsulation de composés de masse moléculaire élevée, les lipo-

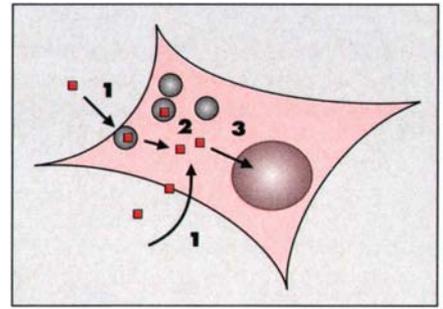


Figure 1. **Barrières au transfert de gènes dans les cellules mammifères.** Trois obstacles majeurs doivent être franchis par le gène avant qu'il puisse s'exprimer: (1) la membrane plasmique qui empêche le franchissement des grosses molécules à forte charge électrique négative, (2) la dégradation dans les compartiments endosomiques, (3) le passage de la membrane nucléaire pour pénétrer dans le noyau.

somes ont été utilisés, dès la fin des années 1970, comme vecteurs de transfection. L'ADN plasmidique est alors généralement encapsulé dans des liposomes unilamellaires de grande taille (*large unilamellar vesicles*, LUV). Toutefois, la faible efficacité des liposomes classiques a conduit les chercheurs à modifier leur composition lipidique. En effet, après pénétration dans la cellule par endocytose, les liposomes classiques encapsulant l'ADN sont dégradés dans les lysosomes. Pour leur permettre d'échapper à cette dégradation intravésiculaire, des compositions liposomales fusiogènes ont été développées [10]. Ainsi sont apparus les liposomes sensibles au pH, qui deviennent fusiogènes au pH acide de l'endosome et les virosomes qui sont des liposomes dans lesquels des protéines virales fusiogènes ont été insérées dans la bicouche phospholipidique. Cependant, la faible efficacité d'encapsulation de l'ADN dans les liposomes (10 % à 25 %) et leur taille relativement importante (>250nm), difficilement compatible avec l'endocytose, ont conduit à rechercher de nouvelles formulations.

En 1987, Felgner *et al.* (Syntex, Palo Alto, CA, USA) ont développé un lipide cationique synthétique, le chlorure de N-[1-(2,3-dioléoyloxy)

propyl]-N,N,N-triméthylammonium ou DOTMA [11]. Parallèlement, Behr *et al.* (Université de Strasbourg, France) ont mis au point les lipospermines dont la dioctadécylamidoglycylspermine (DOGS, Transfectam[®]) [12, 13]. De par leur charge cationique, ces lipides interagissent avec les groupements phosphate de l'ADN pour former un complexe ADN/lipide et ce, après simple mélange des composés en solution aqueuse. La totalité de l'ADN est alors complexée au lipide. Les structures formées ne sont pas à proprement parler des liposomes, puisqu'elles ne contiennent pas de phase aqueuse interne. Le complexe ADN/lipide, qui généralement possède une charge nette positive, interagit avec la membrane plasmique cellulaire chargée négativement et est ensuite incorporé par la cellule par endocytose non spécifique [14]. L'efficacité de ces lipides comme vecteurs de transfection a été démontrée sur un grand nombre de cellules primaires ou de lignées cellulaires. De très nombreuses autres structures de lipides cationiques ont été depuis synthétisées (voir les revues [15, 16]) (figure 2) et certains composés sont commercialisés comme réactifs de transfection (Tableau 1). Ces lipides cationiques présentent généralement trois parties : (1) une tête polaire cationique aminée qui interagit avec l'ADN ; (2) une partie hydrophobe formée, soit de deux chaînes aliphatiques généralement insaturées et d'au moins 12 carbones chacune, soit d'un dérivé du cholestérol et (3) un bras espaceur entre les deux parties précédentes qui détermine souvent la biodégradabilité du lipide. On peut ainsi distinguer les dérivés monocationiques (comme le DOTMA), polycationiques (comme le DOGS) et les dérivés du cholestérol (comme le diméthylaminoéthane carbamoyl-cholestérol, DC-chol). En règle générale, l'ajout d'un lipide neutre à propriétés fusio-gènes, la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), augmente l'efficacité de transfection des lipides cationiques. La comparaison des différents systèmes publiés n'est pas aisée (différence de type cellulaire, de gène rapporteur, de construction plasmidique...). Il semble toutefois que les lipides polycationiques soient aussi efficaces, si ce n'est plus, que les

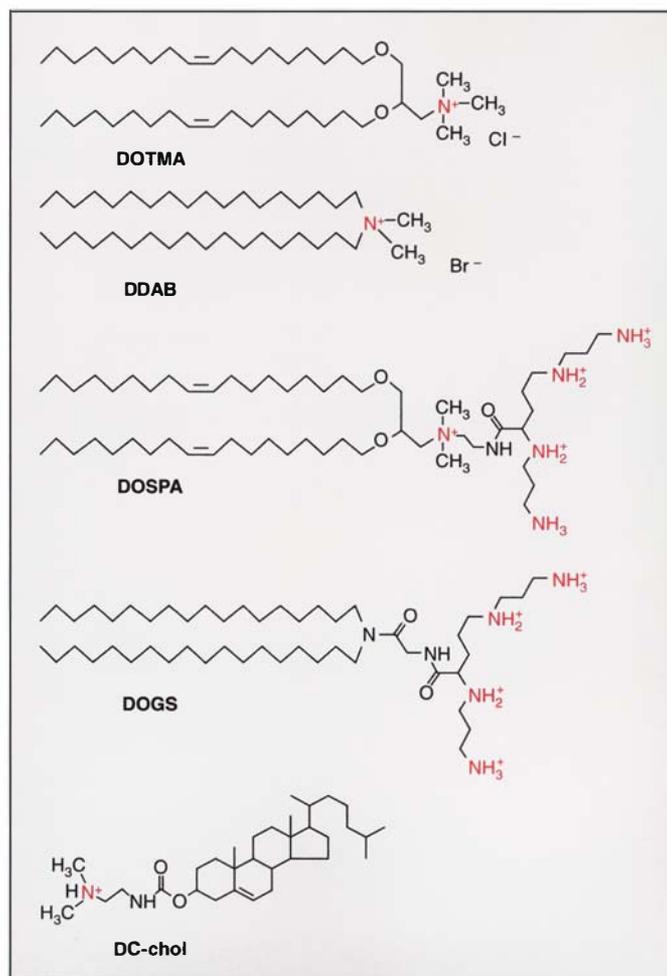


Figure 2. **Structures de différents lipides cationiques.** DOTMA : N-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-triméthylammonium ; DDAB : bromure de diméthyl-dioctadécyl ammonium ; DOSPA : trifluoroacétate de dioléoyl-N-(2-spermincarboxamido) éthyl-N,N diméthyl-1-propanaminium ; DOGS : dioctadécylamidoglycylspermine ; DC-chol : diméthylaminoéthane carbamoyl cholestérol.

lipides mono- ou dicationiques. Cette différence pourrait s'expliquer par une affinité plus grande des systèmes polycationiques pour l'ADN. Une autre hypothèse est fondée sur le fait que seules trois des quatre amines présentes sur la tête polaire sont chargées à pH physiologique. Lorsque le complexe ADN/lipide polycationique pénètre dans la cellule par endocytose, les endosomes contenant les complexes suivent un processus d'acidification. Lors de l'entrée de protons, concomitante d'une entrée passive d'ions chlorure, la dernière amine de la lipospermine se protonerait, jouant ainsi le rôle de tampon. L'augmentation consécutive de l'osmolarité de

l'endosome se terminerait par la rupture de la membrane endosomale avec une libération accrue d'ADN dans le cytoplasme cellulaire [12-14]. Cette particularité d'action serait partagée avec certains polymères cationiques, comme nous le verrons plus loin dans cet article.

Les conditions optimales de transfection *in vitro* obtenues avec l'ensemble des lipides cationiques impliquent généralement un rapport de charges +/- (lipide/ADN) positif. De tels complexes injectés *in vivo*, soit interagiraient immédiatement avec la matrice extra cellulaire, soit seraient opsonisés et éliminés par le système réticulo-endothélial. Pour cette raison, des stratégies tendant à utiliser

RÉFÉRENCES

16. Gao X, Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* 1995; 2: 710-22.
17. Remy JS, Kichler A, Mordinov V, Schuber F, Behr JP. Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1744-8.
18. Schwartz B, Benoist C, Abdallah B, Scherman D, Behr JP, Demeineix BA. Lipospermine-based gene transfer into newborn mouse brain is optimized by a low lipospermine/DNA charge ratio. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 1515-24.
19. Wu G, Wu CH. Evidence for targeted gene delivery to HepG2 hepatoma cells *in vitro*. *Biochemistry* 1988; 27: 887-92.
20. Midoux P, Mendes C, Legrand A, Raimond J, Mayer R, Monsigny M, Roche AC. Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 871-8.
21. Erbacher P, Bousser MT, Raimond J, Monsigny M, Midoux P, Roche AC. Gene transfer by DNA/glycosylated polylysine complexes into human blood monocyte-derived macrophages. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 721-9.
22. Michael SI, Curiel DT. Strategies to achieve targeted gene delivery *via* the receptor-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther* 1994; 1: 223-32.
23. Ferkol T, Perales JC, Mularo F, Hanson RW. Receptor-mediated gene transfer into macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 101-5.
24. Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3410-4.
25. Cotten M, Wagner E, Zatloukal K, Phillips S, Curiel DT, Birnstiel ML. High efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kb) gene constructs using the endosome disruption activity of defective or chemically-inactivated adenovirus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6094-8.
26. Wagner E, Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Birnstiel ML. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7934-8.
27. Haensler J, Szoka FC. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate Chem* 1993; 4: 372-9.
28. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeineix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7297-301.
29. Legendre JY, Szoka FC. Cyclic amphiphilic peptide-DNA complexes mediate high-efficiency transfection of adherent mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 893-7.
30. Gottschalk S, Sparrow JT, Hauer J, Mims MP, Leland FE, Woo SLC, Smith LC. A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells. *Gene Ther* 1996; 3: 448-57.
31. Cheng PW. Receptor ligand-facilitated gene transfer: enhancement of liposome-mediated gene transfer and expression by transferrin. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 275-82.
32. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Wong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; 247: 1465-8.
33. Morgan JE. Cell and gene therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 1994; 4: 165-73.
34. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993; 259: 1745-9.
35. Mumper RJ, Duguid JG, Anwer K, Barron MK, Nitta H, Rolland AP. Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm Res* 1996; 13: 701-9.
36. Williams RS, Johnston SA, Riedy M, DeVit MJ, McElligott SG, Sanford JC. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2726-30.
37. Tang DC, DeVit MJ, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356: 152-4.
38. Zhu N, Liggitt D, Liu Y, Debs R. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 1993; 261: 209-11.
39. Thierry AR, Lunardi-Iskandar Y, Bryant JL, Rabinovich P, Gallo RC, Mahan LC. Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9742-6.
40. Lesoon-Wood LA, Kim WH, Kleinman HK, Weintraub BD, Mixson AJ. Systemic gene therapy with p53 reduces growth and metastases of a malignant human breast cancer in nude mice. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 395-405.

des complexes ADN/lipide cationique neutres, ciblés ou non, sont actuellement développées [17, 18].

• Systèmes ciblés et complexes peptidiques

Ces techniques reposent sur une condensation de l'ADN avec un polycation tel que la polylysine, couplé chimiquement à un ligand capable de reconnaître et de se lier à un récepteur spécifique sur une population cellulaire cible. La liaison du ligand à son récepteur permet l'endocytose du complexe ADN/polycation-ligand, conduisant à l'introduction de l'ADN dans la cellule cible et à son expression (figure 3).

Les premiers travaux ont été réalisés par Wu *et al.* (Université du Connecticut, USA) avec une asialoglycoprotéine pour le ciblage et la transfection d'hépatocytes [19]. D'autres ligands couplés à la polylysine ont servi à valider le concept dans des essais de transfection *in vitro* [20-22] mais aussi *in vivo* [23]. Le plus documenté est la transferrine dont le récepteur est présent sur de nombreux types cellulaires et notamment sur les cellules en phase active de multiplication. Les travaux de Wagner *et al.* (Université de Vienne) ont montré que la principale limite de cette technologie réside dans la compartimentation du complexe transfectant dans des vésicules d'endocytose et dans sa dégradation dans les lysosomes (figures 1 et 3) [23]. Si, *in vitro*, cette barrière peut être surmontée à l'aide d'agents chimiques qui peuvent modifier la fonction de l'endosome, comme la chloroquine, des stratégies plus complexes ont dû être imaginées pour le transfert de gène *in vivo*, comme l'incorporation de particules adénovirales inactivées [25]. L'étape suivante a consisté à écarter les fonctions virales indésirables pour ne garder que les éléments nécessaires à la pénétration cellulaire. Cette démarche est à la base du concept de « virus artificiel » qui consiste à mimer à l'aide de peptides synthétiques les mécanismes de pénétration et d'infection cellulaire élaborés par les virus. Différents effecteurs peptidiques (par exemple le peptide fusiogène de l'hémagglutinine du virus grippal) ont ainsi été incorporés dans les complexes ADN/polylysine-ligand [26]. Une amélioration

Tableau I

LIPIDES CATIONIQUES COMMERCIALISÉS
COMME RÉACTIFS DE TRANSFECTION

Nom commercial	Lipide	Type	Fabricant
Lipofectin	DOTMA/DOPE	monocationique	GibcoBRL
LipofectACE	DDAB/DOPE	monocationique	GibcoBRL
LipofectAMINE	DOSPA/DOPE	polycationique	GibcoBRL
Transfectam	DOGS	polycationique	Promega
Tfx-50	TDOB-DOPE	dicationique	Promega
DOTAP	DOTAP	monocationique	Boehringer Mannheim
DOSPER	DOSPER	polycationique	Boehringer Mannheim
CLONfectin	BTTA	monocationique	Clontech

DOTMA: *N*-[1-(2,3-dioléoyloxy) propyl]-*N,N,N*-triméthylammonium; DOPE: dioléoylphosphatidyléthanolamine; DDAB: bromure de diméthyl dioctadécyl ammonium; DOSPA: trifluoroacétate de dioléoyl-*N*-(2-spermincarboxamido) éthyl-*N,N* diméthyl-1-propanammonium; DOGS: dioctadécylaminoglycylspermine; TDOB: iodure de tétraméthyl-*N,N'*-bis(2-hydroxyéthyl)-2,3-dioléoyloxy-1, 4-butanediammonium; DOTAP: 1,2-bis(oléoyloxy) 3-(triméthylammonio) propane; DOSPER: acétate de 1,3-di-oléoyloxy-2-(6-carboxy-spermyl)-propylamide; BTTA: *N*-butyl-*N'*-tétradécyl-3-tétradécylaminopropion-amidine.

de l'activité de ces systèmes a été le remplacement de la polylysine par des polymères cationiques tels que les dendrimères polyamidoaminés [27] ou la polyéthylèneimine [28] qui semblent posséder une activité endosomolytique intrinsèque. Ces polymères représentent une nouvelle classe d'agents transfectants très prometteurs et des travaux sont en cours dans le laboratoire de J.P. Behr pour adapter la polyéthylèneimine à des formulations injectables [13]. Cependant, le problème avec l'ensemble de ces différents systèmes est que la forte affinité des polycations pour les cellules limite la capacité de ciblage du ligand qui s'y trouve lié. De plus, les polycations sont connus pour interagir avec de nombreuses protéines sériques et pour activer certains facteurs du complément. Pour des applications *in vivo* d'autres molécules ont été proposées, pouvant servir à attacher des effecteurs synthétiques sur l'ADN, comme des agents intercalants. Une autre voie consiste également à développer de courts peptides cationiques capables à la fois de se lier à l'ADN pour former des complexes neutres ou chargés négativement et de déstabiliser les membranes cellulaires [29, 30]. Notons enfin que le ciblage d'une population cellulaire donnée peut également s'effectuer en ayant recours à des plasmides comprenant

des promoteurs spécifiques de tissu ou que l'on peut activer par administration concomitante d'autres composés (antibiotiques, corticoïdes...) [9].

Des améliorations sont attendues dans un avenir proche puisque l'élégance et la simplicité de l'approche font que la plupart des équipes et des sociétés spécialisées dans la thérapie génique développent les capacités nécessaires à faire aboutir ce concept prometteur de « virus artificiel ». Déjà, des systèmes mixtes alliant un lipide cationique et un ligand ont été développés avec des résultats *in vitro* prometteurs [17, 31].

• Transfection par ADN non complexé à un vecteur

En 1990, le groupe de Wolff (Université du Wisconsin, USA) observa que de l'ADN plasmidique non complexé à un vecteur (ADN nu) ou de l'ARN messager codant pour des marqueurs protéiques pouvaient s'exprimer après administration directe dans les tissus [32]. Bien que l'expression des gènes rapporteurs utilisés puisse être détectée après injection directe dans un certain nombre de tissus (foie, poumons, articulation, thyroïde, tumeur), les travaux de Wolff montraient que l'administration des gènes dans les muscles squelettique ou cardiaque donnait les meilleurs résultats en terme de rendement

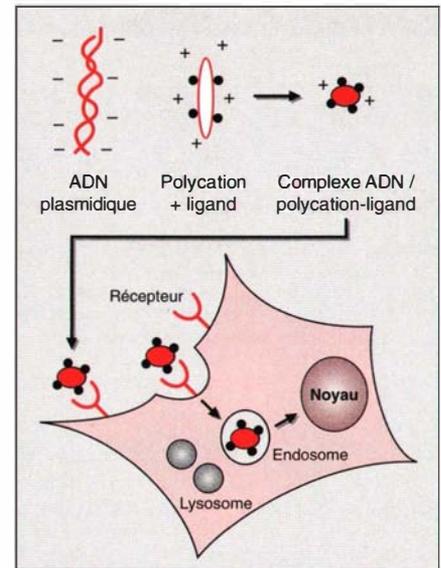


Figure 3. Principe du transfert de gènes par système ciblé. Le polycation sur lequel l'ADN est condensé porte, en outre, un ligand susceptible de reconnaître un récepteur spécifique de la cellule vers laquelle l'ADN est ciblé. Le complexe ADN-polycation-ligand pourra alors être internalisé par endocytose. Échapper à la dégradation dans les endosomes demande une modification de la fonction de ces organites, par la chloroquine, par exemple. De plus des systèmes ont été imaginés à partir du modèle d'infection par les virus, en greffant par exemple un peptide fusiogène.

d'expression (quantité de protéine produite). Ces travaux permettaient également d'observer que, malgré un faible taux de transfection, l'expression du transgène dans le muscle pouvait durer plusieurs mois sans réplication ni intégration apparente du plasmide injecté.

Les différents groupes qui exploitèrent cette observation ont rapidement réalisé que la quantité de protéine produite par les fibres musculaires transfectées ne suffirait pas à corriger des maladies héréditaires comme, par exemple, la myopathie de Duchenne [33]. En revanche, en utilisant un plasmide codant pour un antigène protéique, l'injection intramusculaire directe conduit à un taux d'expression suffisant pour induire une forte réponse immunitaire spécifique (*m/s n° 5*,

RÉFÉRENCES

41. Tsukamoto M, Ochiya T, Yoshida S, Sugimura T, Terada M. Gene transfer and expression in progeny after intravenous DNA injection into pregnant mice. *Nat Genet* 1995; 9: 243-8.

42. Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ. Site-specific gene expression *in vivo* by direct gene transfer into the arterial wall. *Science* 1990; 249: 1285-8.

43. Nabel EG, Gordon D, Yang ZY, Xu L, San H, Plautz GE, Wu BY, Gao X, Huang L, Nabel GJ. Gene transfer *in vivo* with DNA/liposome complexes, lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum Gene Ther* 1992; 3: 649-56.

44. Johnson LG. Gene therapy for cystic fibrosis. *Chest* 1995; 107: 77S-83S.

45. Hyde SC, Gill DR, Higgins CF, Trezise AEO, McVinish LJM, Cuthbert AW, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH. Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy. *Nature* 1993; 362: 250-5.

46. Meyer KB, Thompson MM, Levy MY, Barron LG, Szoka FC. Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid expression and pharmacokinetics. *Gene Ther* 1995; 2: 450-60.

47. Stribling R, Brunette EB, Liggitt DL, Gaensler KM, Debs R. Aerosol gene delivery *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1177-81.

48. Horn NA, Meek JA, Budahazi G, Marquet M. Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 565-73.

49. Caplen NJ, Alton EFWF, Middleton PG, Dorin JR, Stevenson BJ, et al. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nature Med* 1995; 1: 39-46.

50. Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, Plautz GE, Gao X, Huang L, Shu S, Gordon D, Chang AE. Direct gene transfer with DNA/liposome complexes in melanoma, expression, biologic activity and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11307-11.

51. Fischer A, Schatz C. Thérapie génique. *Thérapie* 1995; 50: 369-74.

52. McGregor RR, Gluckman S, Lacy K, Kanielski B, Boyer J, et al. First human trial of a facilitated DNA plasmid vaccine for HIV-1: safety and host response. Abstract We.B.293. *XIth International Conference on AIDS*, Vancouver, July 7-12, 1996.

m/s n° 12, vol. 12, décembre 96

Tableau II

CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES SYSTÈMES NON VIRAUX

Plasmide	Complexe plasmide/vecteur
<ul style="list-style-type: none"> • identité • forme (linéaire, circulaire) • concentration • pureté (protéines, endotoxines, ARN...) • expression de la protéine codée 	<ul style="list-style-type: none"> • structure • taille • charge • densité • proportion entre les constituants • fraction de l'ADN associé au complexe • homogénéité et reproductibilité de la préparation • stabilité (aggrégation, température...) • efficacité de transfection (modèle <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>)

vol. 8, p. 501; n° 4, vol. 9, p. 482) [34]. La production par les fibres musculaires transfectées de protéines excrétées dans la circulation générale et agissant sur des organes plus lointains (comme l' α -1 antitrypsine ou l'érythropoïétine) fait également l'objet d'intenses recherches. Aujourd'hui, on tente d'élucider le mécanisme par lequel les cellules musculaires internalisent l'ADN nu afin d'élaborer des stratégies pour stimuler ce processus [35].

Dans la lignée des travaux de Wolff, d'autres équipes ont montré la possibilité de faire exprimer un transgène *in vivo* et d'induire une réponse immunitaire contre la protéine codée par ce transgène en bombardant la peau avec de l'ADN plasmidique adsorbé sur des particules d'or ou de tungstène (*gene gun*) [36]. Même si, du fait du renouvellement continu des cellules de l'épiderme, l'ADN administré dans les couches superficielles de la peau ne possède pas la stabilité de l'ADN introduit dans les cellules musculaires, il a été démontré que la vaccination par ADN plasmidique pouvait bénéficier de cette technique en termes de qualité et d'amplitude des réponses induites [37].

Depuis, il a été montré dans de nombreux modèles animaux de maladies infectieuses ou de cancers que l'immunisation par injection directe d'ADN plasmidique dans le muscle ou la peau (*m/s n° 1, vol. 11, p. 527*) permet la production d'antigènes

protéiques *in situ* et l'induction de réponses immunitaires protectrices, humorales et cellulaires, sans l'aide d'adjuvants.

Problèmes posés par l'administration *in vivo* des systèmes non viraux

Quel que soit le système de transfection utilisé, un certain nombre de problèmes généraux se posent lorsque l'on considère son utilisation *in vivo* et, notamment, par voie systémique. En effet, l'ADN plasmidique nu injecté par voie intraveineuse à un animal subit une dégradation très rapide au niveau du système réticulo-endothélial (principalement le foie) et a une demi-vie plasmatisque très courte. La complexation de l'ADN par un système de transfection peut permettre de modifier sa distribution et d'obtenir des taux de transfection significatifs après administration intraveineuse chez l'animal. Les poumons, le foie et, dans une moindre mesure, la rate et le cœur, sont les principaux organes dans lesquels l'expression du gène administré est détectée après injection intraveineuse de complexes ADN/lipide cationique [38, 39]. De façon tout à fait intéressante, il a récemment été démontré que l'administration intraveineuse du gène *p53* humain complexé à des lipides cationiques pouvait entraîner la régression de tumeurs humaines implantées chez

la souris *nude* [40]. Une autre équipe a également montré l'expression de gènes rapporteurs chez le fœtus après injection de complexes ADN/lipide cationique chez la souris en gestation [41]. Malgré ces résultats prometteurs obtenus après injection intraveineuse, les problèmes posés par l'administration dans la circulation générale de complexes ADN/vecteur restent multiples : déstabilisation des complexes par les protéines endogènes, activation du système du complément par les particules cationiques, modification des paramètres de l'hémostase, immunogénicité possible des systèmes peptidiques, sites d'expression multiples et difficilement contrôlables.

Pour ces différentes raisons, l'intérêt actuel des systèmes non viraux réside essentiellement dans leur utilisation par voie locale. De très nombreux travaux ont montré la possibilité de faire exprimer des gènes après administration *in situ* dans l'organe de choix par des techniques non virales. Nabel *et al.* (Université du Michigan, USA) ont administré par l'intermédiaire d'un cathéter à double ballonnet un composé ADN/lipide cationique dans l'artère iléofémorale de porc et ont montré l'expression de différents gènes dans les cellules musculaires lisses de la paroi [42]. La même équipe a également étudié l'administration intratumorale de gènes étrangers du système majeur d'histocompatibilité complexés à un dérivé cationique du cholestérol, le DC-chol [43]. Les résultats préliminaires ont montré que l'expression du gène était restreinte à la tumeur et qu'il n'y avait pas de dissémination de l'ADN administré dans d'autres organes. En outre, les études de toxicité n'ont mis en évidence aucune modification des paramètres biochimiques ou physiologiques courants. Le recours à la voie pulmonaire constitue également un axe majeur de recherche, notamment pour ce qui concerne la thérapie génique de la mucoviscidose [44, 45]. L'instillation intratrachéale de composés lipides cationiques a permis la transfection de cellules pulmonaires mais, en ce qui concerne cette voie d'administration, l'avantage des lipides cationiques par rapport à l'ADN nu n'est pas clairement établi, car des niveaux de transfection similaires ont

été observés avec ces deux techniques chez l'animal [45, 46]. L'expression de transgènes dans les poumons après aérosolisation directe de complexes ADN/lipide cationique a également été démontrée même si l'uniformité de distribution des particules transfectantes au niveau pulmonaire, la stabilité de ces mêmes particules et du plasmide lors de l'aérosolisation ainsi que les importantes quantités d'ADN mises en jeu restent autant de problèmes à résoudre [47]. De plus, de récentes études ont montré des signes d'inflammation pulmonaire transitoire lors de l'administration de lipides cationiques par aérosol chez la souris et le singe.

Les études cliniques

Ces différentes études effectuées chez l'animal ont donc démontré qu'il est possible de faire exprimer des gènes dans des tissus après administration non virale et ont permis d'envisager les premiers protocoles cliniques chez l'homme. Toutefois, avant cette étape, il a fallu se préoccuper de la production à relativement large échelle de complexes d'ADN plasmidique de qualité reproductible compatible avec des essais cliniques de thérapie génique [48]. Tout d'abord, l'ADN plasmidique doit être produit selon des procédés de fabrication assurant une qualité pharmaceutique et un certain nombre de contrôles doivent être entrepris pour s'assurer des caractéristiques du produit final (Tableau II). L'ensemble de ces procédés s'inspire de ceux employés pour la production des protéines recombinantes. Ainsi, après introduction du plasmide dans la souche bactérienne de choix et la fermentation, l'un des procédés de production recommandé fait appel à la lyse alcaline des bactéries puis à une centrifugation suivie d'une filtration. Ensuite, l'ADN est précipité par le polyéthylène glycol et purifié sur colonnes chromatographiques successives. Reste à envisager la production des particules transfectantes contenant l'ADN. Les grandes quantités de matériel nécessaires aux études cliniques posent le problème de la complexation de l'ADN à des concentrations élevées. Dès lors, la précipitation des complexes polycationiques peut survenir. Afin de pal-

lier ce problème, des méthodes par addition très lente de liposomes cationiques à des solutions d'ADN ou par centrifugation sur gradient ont été développées. Ensuite, la caractérisation physico-chimique des vecteurs d'ADN doit être entreprise pour s'assurer de la qualité de la préparation (Tableau II). Enfin, de récentes études ont démontré qu'il est possible de lyophiliser des complexes ADN/lipide cationique sans perdre leur activité de transfection [9].

Les systèmes non viraux représentent actuellement environ le quart de l'ensemble des essais cliniques de thérapie génique [3, 7]. Des résultats encourageants ont été obtenus par Caplen *et al.* (Londres, Grande-Bretagne) dans le domaine de la mucoviscidose [49]. Quinze patients atteints de mucoviscidose ont été inclus dans cet essai de phase I et un complexe DC-chol-DOPE/gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane regulator*) a été instillé par voie nasale. Aucune toxicité n'a été rapportée et une restauration partielle de l'activité *CFTR* (environ 20 % de l'activité normale) a été observée de façon transitoire. D'autres résultats prometteurs ont aussi été publiés par l'équipe de Nabel sur cinq patients traités pour mélanome [50]. L'injection intratumorale du gène *HLA-B7* (environ 2 à 8 µg d'ADN par patient) codant pour un antigène étranger du complexe majeur d'histocompatibilité et complexé à des liposomes cationiques a permis l'expression du gène pendant trois à sept jours après injection et ce, uniquement au niveau de la tumeur. De plus, les nodules ont régressé chez un des patients. Une approche similaire avec le gène de l'interleukine-2 est également utilisée dans un autre essai clinique. Notons enfin que deux protocoles faisant appel à des lipides cationiques sont en cours d'évaluation en France [51] : l'un dans le traitement du glioblastome inopérable (CHU La Tronche, Grenoble) et l'autre dans le transfert de monocytes autologues (Hôpital Hautepierre, Strasbourg). Des protocoles utilisant de l'ADN plasmidique nu, non complexé à un vecteur, sont également en cours. C'est le cas d'un essai au St Elizabeth's Medical Center de Boston (MA, USA) dans le domaine de la resténose artérielle où l'ADN (le gène codant pour le VEGF,

vascular endothelial growth factor) est incorporé dans un hydrogel lui-même déposé dans l'artère par un cathéter lors de l'angioplastie. Enfin, des protocoles cliniques de vaccination ont été élaborés dans le cadre du SIDA [52] et de la grippe. Ils sont en cours de réalisation.

En conclusion, ces dernières années ont vu un effort considérable de recherche dans le développement de nouveaux vecteurs non viraux de gènes. Ces travaux ont conduit à l'élaboration de systèmes lipidiques, peptidiques ou polymériques, ciblés ou non, capables de transférer efficacement des cellules en culture mais aussi différents tissus dans des modèles animaux. Toutefois, l'efficacité de transfection de ces systèmes reste encore dans la plupart des cas inférieure à celle des vecteurs viraux. De plus, malgré quelques résultats encourageants chez l'animal et même chez l'homme, l'utilisation des techniques non virales *in vivo* se heurte encore à de nombreux problèmes, notamment de biodisponibilité, d'efficacité de transfection et de durée d'expression. Une amélioration de l'efficacité de ces composés passe obligatoirement par une compréhension de leur physico-chimie et des facteurs contrôlant leur devenir dans la cellule et dans l'organisme. En effet, la formation des complexes ADN/vecteur reste encore très largement empirique et leur mécanisme d'action très mal élucidé. Il est encore trop tôt pour savoir qui des virus ou des systèmes non viraux, voire des systèmes hybrides, sera utilisé dans le futur. Il est probable qu'on disposera de différents systèmes, pour un organe cible, une application thérapeutique ou une voie d'administration. Cependant, si l'efficacité des vecteurs non viraux se rapproche de celle des virus, leur faible toxicité et leur relative facilité de production en tant que produits biopharmaceutiques en feraient une approche très attrayante. Déjà, le recours à l'ADN plasmidique injecté directement dans le muscle semble être une voie très prometteuse dans le développement des vaccins du futur ■

TIRÉS À PART

J.Y. Legendre.

Remerciements

Les auteurs remercient le Dr Alain Rolland (GeneMedicine, The Woodlands, TX, USA) pour ses précieux commentaires lors de la réalisation de ce manuscrit.

Summary

Non-viral gene delivery systems

One of the central challenges in gene therapy is to find safe vectors capable of transporting genes efficiently into the target cells. Therefore a suitable DNA carrier must be designed to allow subsequent expression of the gene at a therapeutic level and, if possible, restricted to the organ to be treated or to produce the transgene. Encouraging results both in animals and humans have been obtained using viruses. However, safety concerns about viral vectors have led researchers to develop parallel non-viral systems. These systems include liposomes, cationic lipids, targeted and peptide-based systems, and polymers, as well as direct injection of plasmid DNA into tissues. Although expression of foreign genes has been obtained in animals after systemic administration of DNA/carrier complexes, kinetics and sites of expression still cannot be controlled after intravenous injection. Therefore, non-viral systems are mainly used by local route and promising results have been obtained in different animal models. Human clinical trials using cationic lipids are now underway in cystic fibrosis and cancer and preliminary data have demonstrated the feasibility as well as the safety of this type of approach. However, therapeutic effects have yet to be demonstrated. The design of efficient non-viral systems for gene therapy will require a better understanding of their physico-chemistry and the mechanism by which they deliver DNA into the cell.

Cours de Biologie Moléculaire de la Cellule

Enseignement pratique 10 mars-13 avril 1997

Ce cours, conjointement organisé par l'Institut Pasteur et l'Institut Curie, se déroulera du 10 mars au 13 avril 1997 à plein temps, à l'Institut Pasteur à Paris. Il est destiné à des chercheurs du secteur public et privé, ayant une formation des facultés de sciences, de médecine, de pharmacie ou des écoles vétérinaires. Les candidats doivent avoir une bonne connaissance, niveau maîtrise, en biologie moléculaire. Les techniques de base de biologie moléculaire ne seront pas enseignées (exemple : clonage, séquençage de gènes, etc.). Ce cours donne lieu à un diplôme de l'Institut Pasteur suite à un examen qui se déroulera à la fin du mois d'avril.

Le thème central de ce cours concerne l'étude de la cellule eucaryote. Cet enseignement est très orienté vers l'initiation expérimentale, et fera une large place aux nouvelles techniques ainsi qu'à la démarche scientifique actuelle pour l'étude des fonctions cellulaires. Les travaux pratiques seront accompagnés de conférences théoriques sur les thèmes suivants :

- Organisation fonctionnelle de la cellule : compartiments membranaires, cytosquelette, polarité cellulaire
- Les routages intracellulaires : transport des protéines membranaires et sécrétées, endocytose des macromolécules
- Les contacts et la communication entre cellules
- La signalisation et la transduction des messages cellulaires
- Le cycle cellulaire

Les techniques mises en œuvre seront celles de l'analyse génétique, la transfection et l'expression de gènes clonés, la culture cellulaire, la reconstitution *in vitro* des fonctions cellulaires, la visualisation des constituants cellulaires y compris par les techniques les plus récentes de microscopie confocale et d'imagerie.

Avec la participation de : S. Amigorena, M. Arpin, M. Bornens, E. Chanal, P. Chardin, J. Cohen, P. Cossart, E. Coudrier, F. Dautry, A. Dauby-Varsat, S. Dufour, E. Fabre, E. Friederich, B. Goud, B. Hoflack, C. Hopkins, D. Job, E. Karsenti, F. Képès, P. Legrain, D. Louvard, B. Maro, D. Montarras, S. Pelligrini, Ch. Pinset, E. Schiebel, L. Sperling, J.-P. Thiéry et M. Weiss. Les cours théoriques seront assurés par des enseignants français et européens.

Responsables du cours : A. Dautry-Varsat et D. Louvard
Renseignements et Inscriptions, date limite le 1^{er} décembre 1996
Mme Bonisso
Secrétariat des Enseignements et des Stages
Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris - Cedex 15, France.
Tél : 01 45 6881 41 ou 01 40 61 33 62 - Fax : 01 40 61 30 46