



**LES TRANSVERSALES SANTÉ**  
de Paris Innovation  
en association avec Medicen Paris Region

## SYNTHESE

---

### → Les acides nucléiques comme outils thérapeutiques

Mardi 18 mars 2008  
18h30 – 21h  
Medicen Paris Région

#### **Intervenants :**

**Jian-Sheng SUN**, CEO, DNA Therapeutics, Evry.

**Annick HAREL-BELLAN**, laboratoire « Epigénétique et Cancer », Institut André Lwoff, Villejuif.

**Pierre CHARNEAU**, Laboratoire Virologie moléculaire et vectorologie, Institut Pasteur, directeur scientifique de TheraVectys, Paris.

**Pierre LOULERGUE**, Praticien hospitalier, CIC de vaccinologie Cochin-Pasteur AP-HP, Inserm CIC BT505, Université Paris Descartes

**Grand Témoin : Eric LE CAM**, Directeur de recherche au CNRS, Institut Gustave Roussy, UMR 8126 Interactions moléculaires et cancer, Laboratoire de Microscopie moléculaire et cellulaire, Villejuif

*Depuis quelques années, l'émergence de technologies utilisant des structures d'ADN ou d'ARN a donné un nouveau souffle au génie génétique à visée thérapeutique. Elles offrent en effet une palette inédite de moyens de réguler ou modifier l'expression de gènes. ADN inhibiteurs, petits ARN interférents, et vaccins à ADN : cette transversale a illustré quelques facettes parmi les plus prometteuses d'un domaine en rapide évolution.*

## Des ADN inhibiteurs contre la résistance des cellules cancéreuses

### Jian-Sheng SUN

CEO, DNA Therapeutics, Evry

[sun@dna-therapeutics.com](mailto:sun@dna-therapeutics.com)

La technologie innovante de DNA Therapeutics, les « siDNA » (short inhibiting DNA), s'inscrit dans l'histoire des oligonucléotides thérapeutiques. Les antisens, leur première grande famille, sont de courtes molécules synthétiques d'ADN modifiées à partir d'une séquence cible appartenant à un ARN messenger. Ils possèdent deux mécanismes d'action : soit ils créent, par leur hybridation avec leur cible, un substrat pour une enzyme de dégradation des ARN appelée RNase-H ; soit ils provoquent, du fait de leur interaction avec la cible, un blocage physique de la traduction. Le leader du domaine est ISIS Pharmaceuticals (Carlsbad, Californie ; ISIS@Nasdaq), qui a développé Vitravene (fomivirsén), le premier antisens autorisé sur le marché (août 1998) pour soigner la rétinopathie liée à l'infection par le cytomégalovirus chez les patients atteints de sida.

### ODN CpG, aptamères, decoys, micro-ARN...

La deuxième grande famille d'oligonucléotides à visée thérapeutique comprend des ADN contenant des séquences CpG (cytosine-phosphate-guanine), ou des ARN possédant d'autres motifs, capables de stimuler la réponse immunitaire via une famille de récepteurs, les TLR (Toll-like receptors). Coley Pharmaceuticals (Wellesley, Massachusetts) a été un acteur majeur, acquis par Pfizer en décembre 2007 pour 168 millions de dollars. Idera Pharmaceuticals (Cambridge ; IDRA@Nasdaq) est devenue le leader du domaine.

Troisième famille, les aptamères sont issus de processus de sélection réalisés par la technologie SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) à partir de banques d'oligonucléotides aléatoires. Ils agissent comme des anticorps en se fixant sur des récepteurs. Eyetech Pharmaceuticals (New York) commercialise depuis 2005 le Macugen (pegaptanib de sodium), un aptamère anti-VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) pour le traitement de la forme humide (exudative) de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Depuis, Eyetech a été acquise par OSI Pharmaceuticals (Melville, NY ; OSIP@Nasdaq) pour 650 millions de dollars. Archemix (Cambridge, MA) est le leader actuel du domaine.

Les moins connus des oligonucléotides thérapeutiques sont des molécules d'ADN double brin appelées « decoys » utilisées pour piéger des facteurs de transcription tels que STAT1 ou NFκB, afin de traiter certaines inflammations et allergies. Les leaders du domaine sont AnGes MG (Tokyo ; 4562@TSE) et Avontec (Munich).

Les microARN et ARN interférents sont des outils de recherche fondamentale et thérapeutique de plus en plus utilisés qui donnent lieu à des mouvements industriels importants. Ainsi, la société Sirna Therapeutics (San Francisco) a été acquise en décembre 2006 par Merck & Co pour près d'1,1 milliard de dollars. Les leaders du domaine sont Alnylam Therapeutics (Cambridge, MA ; ALNY@Nasdaq) et Silencing Therapeutics (London & Berlin ; LSE:SLN@AIM).

Enfin, un nouveau type d'oligonucléotides, dit d'interférence ADN (DNAi), est développé par une société de biotechnologie, ProNAi Therapeutics (Kalamazoo, Michigan).

### L'approche par ADN inhibiteurs

Par rapport à tous ces oligonucléotides, qui ont en commun de reconnaître une cible d'ADN ou d'ARN, ou encore une protéine, l'approche par « siDNA » (*short inhibiting DNA*) de la société DNA Therapeutics se veut différente et complémentaire. Elle vise à contrer les résistances des cellules cancéreuses aux traitements conventionnels.

Ces phénomènes, notamment les radiorésistances, sont liés au fait que certaines de ces cellules, notamment les cellules souches tumorales, ont la capacité de signaler et réparer efficacement les dommages à l'ADN. Comme on ne peut augmenter indéfiniment la dose cytotoxique ou d'irradiation, elles survivent à la chimiothérapie ou à la radiothérapie.

Notre sponsor



La technologie de DNA Therapeutics consiste à piéger le système de réparation des cassures double brin de l'ADN à l'aide de courtes molécules d'ADN appelées « *DNA baits* » (appâts d'ADN) ou Dbaits. Les Dbaits inhibent la réparation de l'ADN en interagissant avec certaines composantes du complexe enzymatique DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*). Les tumeurs résistantes redeviennent alors sensibles aux traitements conventionnels.

### **Quelle concurrence ?**

Le concept de réparation de l'ADN comme cible thérapeutique est reconnu par les industriels comme AstraZeneca ou Pfizer et des sociétés de biotechnologie comme Genentech et Inotek Pharmaceuticals. Cependant, sur la voie DNA-PK, les Dbaits de DNA Therapeutics sont actuellement sans concurrence directe. Les seules molécules en développement destinées à inhiber la réparation de l'ADN visent les enzymes PARP (*Poly(ADP-ribose) polymerases*) (KuDos/AstraZeneca, Pfizer, Genentech/Inotek), d'autres voies d'inhibition de kinases ayant été abandonnées.

Les Dbaits agissent comme des mimes de cassures double brin de l'ADN. Ils diffèrent à la fois des anticorps monoclonaux, des aptamères ou des inhibiteurs de kinases, qui ciblent spécifiquement une protéine, et des oligonucléotides de type antisens ou ARN interférents, qui interagissent avec les ARN messagers. En effet, la séquence cible du Dbaït n'a aucune importance. C'est sa structure moléculaire qui est reconnue par la machinerie de réparation de l'ADN, qui n'est pas spécifique d'une séquence d'ADN particulière. Cette technologie introduit ainsi le concept de thérapie « supra-moléculaire » (les autres technologies relevant de la thérapie moléculaire).

### **La monothérapie par Dbaits, ou en association avec la radiothérapie**

Sur des xéno greffes de tumeurs humaines résistantes réalisées chez des souris *nude*, nous avons observé qu'au-delà de certaines doses de Dbaits, existe un effet antitumoral (monothérapie). Cet effet est amplifié en association avec la radiothérapie. L'effet est reproductible et dépendant de la dose de Dbaït. A haute dose, certaines tumeurs régressent complètement, sans récurrence durant plus d'un an et demi. Tous les types tissulaires de tumeurs radiorésistantes répondent au traitement, que ce soit par injection intratumorale ou intrapéritonéale. Celui-ci est bien toléré, aucun signe de toxicité ou de réponse immunitaire n'ayant été détecté.

### **Stratégie de développement**

La préformulation des Dbaits a été effectuée sous forme de nanoparticules de polyéthylèneimine (PEI). Le plan de passage aux essais précliniques réglementaires est prêt. Avec cinq salariés et le concours de différents organismes, DNA Therapeutics peut compter sur dix personnes à plein temps. Elle s'appuie sur deux grandes familles de licences exclusives et mondiales. Labellisée jeune entreprise innovante (JEI) par le ministère de la recherche et SME (*small and medium-sized enterprise*) par l'agence européenne du médicament (EMA), l'entreprise bénéficie de bonnes conditions de développement.

A court terme, DNA Therapeutics va poursuivre la validation de sa technologie pour des indications de niche dans lesquelles la radiothérapie utilisée comme standard de traitement est en échec thérapeutique à cause de la radio-résistance, cela en association avec la radiochirurgie stéréotaxique et la radiothérapie hypo-fractionnée. A plus long terme, nous espérons passer à des indications plus courantes en oncologie via l'administration systémique de nos médicaments, en association avec la radiothérapie fractionnée et la chimiothérapie.

### **Pour en savoir plus**

[www.dna-therapeutics.com](http://www.dna-therapeutics.com)

Dossier cancérologie 2006, Paris Développement

<http://www.parisdeveloppement.com/la-technopole-parisienne/3-poles-innovants/pole-sante/actualites-du-pole-sante/dossiers-dactualites-sante/dossier-cancerologie-2006.html>

Notre sponsor



## Les promesses des petits ARN

**Annick HAREL-BELLAN**

Laboratoire « Epigénétique et Cancer », Institut André Lwoff, Villejuif  
ahbellan@vjf.cnrs.fr

Les petits ARN non codants ont littéralement révolutionné la biologie cellulaire et moléculaire dans les dix dernières années. Ils démontrent l'importance de la recherche fondamentale réalisée sur des organismes qui n'intéressent pas directement la médecine.

### A l'origine, un ver

La première preuve de l'existence d'un petit ARN non codant a été apportée en 1997 par les expériences de l'équipe de Victor Ambros (alors à Harvard) sur les gènes impliqués dans le contrôle au cours du temps du développement du ver nématode *Caenorhabditis elegans*. Ces chercheurs ont mis en évidence que l'expression d'un de ces gènes, *lin-28*, était inhibée par un ARN de 700 nucléotides codé par un autre gène, *lin-4*. En recherchant dans ces 700 nucléotides les régions impliquées, Ambros et ses collaborateurs ont trouvé une petite région de 21 nucléotides partiellement complémentaire de l'ARN correspondant à la protéine Lin-28.

En 1998, Andrew Fire et Craig Mello (prix Nobel 2006) décrivent un processus d'inhibition d'ARN qu'ils appellent l'« interférence ARN ». Leur découverte provient de contrôles d'une expérience testant des oligonucléotides antisens sur *C. elegans*. A leur surprise, un fragment contrôle d'ARN double brin sens et antisens inhibe parfaitement un ARN cible, et même mieux que l'antisens testé. En étudiant le mécanisme sous-jacent, ils montrent que cet ARN double brin est découpé par une enzyme, Dicer, en petits ARN d'une vingtaine de nucléotides, qu'ils nomment « *small interfering RNA* » (siARN), et que ces petits ARN sont les effecteurs de l'inhibition, appelée de ce fait l'interférence ARN.

### Une même voie pour différents petits ARN

De manière étonnante, les ARN précurseurs synthétiques des siARN utilisent la même voie cellulaire que des molécules naturelles codées par l'ADN, les « *primary microRNA* » (pri-miRNA), qui sont les précurseurs des microARN (miARN), un autre type potentiel d'ARN interférents. Dans le noyau cellulaire, ces précurseurs sont transformés par une enzyme, Drosha, en une structure en épingle à cheveux double brin de 70 nucléotides, le pré-miARN. Lequel passe dans le cytoplasme où il est transformé par l'enzyme Dicer en un microARN double brin d'une vingtaine de nucléotides. Celui-ci recrute des protéines, dont les protéines Argonaute, avec lesquelles il forme le complexe RISC (*RNAi Induced Silencing Complex*). Ce complexe retient l'un des deux brins du microARN, le brin actif, qui guide alors le complexe vers l'ARN messenger cible.

Dans le cas des siARN, l'homologie de séquence est complète avec l'ARN messenger cible et le complexe RISC clive l'ARN cible en petits fragments, ensuite dégradés. Dans le cas des microARN, il existe plusieurs situations selon les espèces. Chez les plantes, les microARN ont tendance à être totalement complémentaires de l'ARN messenger, et la situation est donc identique à celle des siARN. Chez les mammifères, dans la plupart des cas, le microARN n'est pas totalement complémentaire de sa cible : celle-ci n'est pas clivée mais l'interaction avec RISC entraîne tout de même une inhibition de la traduction de l'ARNm. De plus, l'ensemble ARNm - RISC - microARN est au moins en partie dirigé vers les « *P-bodies* », structures de dégradation des ARN messagers. Finalement, quel que soit le mode d'interaction avec l'ARN cible, sa concentration diminue à terme dans les cellules.

### Utilisations pratiques des ARN interférents

Aujourd'hui, on utilise l'interférence ARN dans tous les laboratoires de biologie. Chez les mammifères, elle consiste à employer directement des petits ARN synthétiques : soit des ARN interférents double brin (siARN), soit des ARN précurseurs en épingle à cheveux, les « *Short hairpin RNA* » (shARN), lesquels donnent à leur tour des siARN sous l'action de l'enzyme Dicer.

L'inhibition séquence spécifique par les siARN peut être utilisée pour comprendre la fonction des gènes et découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Par exemple, si l'on veut connaître tous les gènes impliqués dans une fonction donnée, on peut réaliser de l'interférence ARN à haut débit. A partir d'une banque de siARN couvrant l'ensemble du génome, on distribue les ARN interférents dans des plaques en même temps que des cellules rapporteurs pour la fonction d'intérêt. Un lipofectant facilite la

Notre sponsor



pénétration des siARN dans les cellules. Quelques jours plus tard, quand les siARN ont inhibé les différents gènes cibles, on peut mesurer la variation de la fonction correspondant à chaque séquence à l'aide des réactifs appropriés.

Une amélioration technique de ce dispositif exploite des puces sur lesquelles on a déposé les siARN en même temps que l'agent de transfection cellulaire. Une fois les cellules placées sur ces lames, on peut mesurer la variation de leur phénotype par des méthodes en fluorescence. Cette technique, développée par l'équipe de Xavier Gidrol au CEA, est avantageuse en temps et en coût.

Lorsque l'on a découvert et validé une cible, on peut encore recourir aux siARN, cette fois comme outils thérapeutiques capables de l'inhiber. De multiples exemples de tels travaux réalisés chez la souris ont été publiés.

### **Des problèmes encore à résoudre**

Les siARN et les microARN ne sont pas complètement spécifiques et peuvent donc toucher des gènes non cibles (effets « hors-cible », « *off-target* »). Un autre problème est de savoir si certains siARN pourraient déclencher une réponse de l'immunité innée médiée par l'interféron.

La vectorisation des siARN dans les cellules n'est pas non plus résolue. Actuellement, trois essais thérapeutiques utilisent des siARN dans le monde. Deux utilisent des ARN nus, et un autre un vecteur, mais on manque de recul pour savoir s'ils peuvent être correctement transférés dans les cellules cibles.

## **Cibler les microARN**

Outre les ARN messagers, la voie naturelle des microARN pourrait elle aussi servir de cible pour des thérapies. Chez tous les organismes vivants, les microARN jouent des rôles importants dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation ou de la mort cellulaire durant le développement, mais également chez l'adulte. Ils pourraient donc constituer des cibles intéressantes, en particulier dans le traitement des cancers, caractérisés par le dérèglement des équilibres entre ces processus cellulaires. Par exemple, l'équipe de Robert Weinberg (MIT, Cambridge) a montré en 2007 que la simple expression d'un seul microARN dans des cellules tumorales (xénogreffes de tumeurs du sein humaines chez la souris) les rend métastatiques.

Pour bloquer des microARN, on peut utiliser des antisens complémentaires du microARN. Notre équipe, à l'Institut André Lwoff, a quant à elle mis au point une technique basée sur les LNA (*Locked Nucleic Acid*), des oligonucléotides dont le sucre est modifié et qui ont une forte affinité pour les séquences de microARN cibles.

Autre petits ARN dont l'inhibition pourrait être d'intérêt thérapeutique : les piARN, molécules d'ARN qui se lient aux protéines argonautes (nécessaires à l'élaboration du complexe RISC) des cellules germinales.

## **Discussion**

### **Vous évoquez le manque de spécificité des siARN. Comment contourner ce problème ?**

En 2006, en effet, des chercheurs ont réalisé un transcriptome de cellules traitées par un siARN. Ils ont observé que la concentration de certains ARN non cibles diminuait également. Une analyse plus précise a montré que ces ARN possédaient une séquence de 9-10 nucléotides homologue d'une partie de la séquence du siARN (*seed sequence*). Ces siARN agissent du coup comme des microARN. Il suffit de le savoir pour éliminer le problème en choisissant correctement les ARN interférents.

**Eric Le Cam**, directeur de recherche au CNRS, Institut Gustave Roussy, UMR 8126 Interactions moléculaires et cancer, Laboratoire de Microscopie moléculaire et cellulaire, Villejuif

Un commentaire sur l'évolution des connaissances sur les acides nucléiques à visée thérapeutique. La stratégie de départ, avec les antisens, cherchait à bloquer la traduction des ARN messagers. Depuis,

Notre sponsor



les recherches ont exploré la diversité des machineries protéiques qui interagissent avec les acides nucléiques. Si bien qu'aujourd'hui la stratégie d'utilisation des oligonucléotides est d'un autre ordre : il s'agit de savoir comment faire recruter efficacement ces machineries protéiques par les oligonucléotides. A ce sujet, y a-t-il des indications suggérant l'existence d'autres complexes nucléoprotéiques d'interaction avec les ARN que ceux que vous avez décrits ?

### **Annick Harel-Bellan**

En fait, le complexe RISC n'est pas complètement caractérisé. On n'est pas sûr de la similarité entre les complexes RISC associés aux siARN et les complexes RISC associés aux miARN. Un autre thème de débat est l'existence de l'inhibition de la transcription par les ARN (et non plus de la traduction). Ce phénomène existe chez les plantes, chez la drosophile, la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Il n'est pas complètement démontré qu'il existe chez les mammifères, auquel cas il impliquerait certainement une machinerie différente.

### **Marie-Louise Michel, Institut Pasteur**

Concernant les Dbait, pouvez-vous éliminer le fait que ces molécules d'ADN double brin activent les cascades des voies interféron ?

### **Jian-Sheng Sun**

Dans les quelques essais que nous avons effectués ou sous-traités pour détecter les réponses immunitaires, nous n'avons pas constaté cela. Les seules réponses interféron observées étaient liées à la présence de séquence CpG.

### **Pierre Charneau**

Qu'en est-il de la délivrance intranucléaire de ces mimiques de cassure double chaîne ?

### **Jian-Sheng Sun**

La molécule double brin Dbait n'a que 32 paires de bases et sa masse moléculaire est de 20 000 daltons. Elle est relativement petite par rapport à la taille des pores nucléaires. De fait, une fois transférée dans la cellule, on la retrouve dans le noyau au bout de deux ou trois heures. Il n'y a nul besoin d'adressage nucléaire.

### **Hervé Tricoire, Institut Jacques Monod**

Est-il envisageable de découvrir des pathologies humaines liées à des microARN qui n'auraient pas d'équivalent chez des espèces modèles et qui, de ce fait, ne pourraient être étudiées chez des modèles ?

### **Annick Harel-Bellan**

Au départ, la prédiction informatique des microARN existant chez l'homme a été faite sur la base de conservations de séquences entre espèces. Maintenant on se rend compte effectivement que certains microARN sont spécifiques de chaque espèce. Mais il est difficile de dire dans quelle mesure cela nous empêchera d'étudier leurs rôles chez des modèles.

### **Eric Le Cam**

Dans le modèle proposé d'activation de la réparation DNA-PK par les Dbait, existe-t-il parallèlement une activation de l'activité de recombinaison ?

### **Jian-Sheng Sun**

Il semblerait plutôt qu'il y ait une inhibition de cette activité.

## **Quelles sont les sociétés qui se développent en France dans le domaine des petits ARN ?**

### **Annick Harel-Bellan**

Notre laboratoire abrite une start-up, SeleXel, qui vise à utiliser l'interférence ARN comme outil thérapeutique dans le cancer de la prostate. Cette entreprise a été fondée par Florence Cabon, Pierre Attali et Etienne Krieger (<http://www.selexel.com/>).

Notre sponsor



## Le point sur les vaccins à ADN

### Pierre LOULERGUE,

Praticien hospitalier, CIC de vaccinologie Cochin-Pasteur AP-HP, Inserm CIC BT505, Université Paris Descartes  
*pierre.loulergue@cch.aphp.fr*

Découverts au début des années 1990, les vaccins à ADN (ou à ADN nu) sont un concept original d'immunisation, une véritable « vaccination génétique ». Leur principe consiste à cloner un gène d'intérêt du pathogène dans un plasmide purifié, sous contrôle d'un promoteur. Son injection par des méthodes classiques (intramusculaires essentiellement, mais aussi intradermiques et intranasales) détermine la production de l'antigène correspondant *in situ* et sa présentation au système immunitaire via les molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité. Il s'ensuit une double réponse immunitaire, cellulaire (T cytotoxique et Th1) et humorale (anticorps).

#### Avantages théoriques

La réponse humorale et cellulaire est en principe prolongée. Cela a pu être vérifié chez des modèles animaux. Les vaccins à ADN offrent la possibilité de combiner plusieurs gènes sur le plasmide. Leur préparation est simple, rapide, reproductible, probablement moins chère en production de masse que celle des vaccins classiques. Les vaccins à ADN se conservent facilement à température ambiante. Ils ne présentent pas de risque infectieux, et semblent bien tolérés d'après les essais réalisés chez l'homme.

#### Inconvénients

L'inconvénient essentiel des vaccins à ADN est leur faible immunogénicité au plan humoral par rapport aux vaccins classiques. En théorie, ils pourraient s'intégrer dans le génome de l'hôte, avec des conséquences fonctionnelles (inhibition ou activation de gènes). A été évoqué aussi le déclenchement de processus d'auto-immunité et le risque d'apparition d'anticorps anti-ADN.

Les stratégies pour augmenter l'immunogénicité consistent à utiliser des adjuvants, et une primo-immunisation par un plasmide associée à un rappel avec un vaccin différent (*prime-boost*), de manière à éviter que la réponse immunitaire déclenchée par le premier vaccin se retourne contre lui. On peut aussi chercher à faire exprimer le gène dans les cellules dendritiques pour induire une amélioration de la présentation de l'antigène aux cellules immunitaires.

#### Les principaux vaccins à ADN en développement

*Préventif (P), Thérapeutique (T)*

Ils concernent surtout les maladies infectieuses : hépatite B (T), VIH (P), hépatite C (P), tuberculose (P), herpès simplex (P), paludisme (P), rage (P), grippe (P), leishmaniose (P). Les cancers concernés sont les cancers du sein, de la prostate, du côlon, le mélanome et les lymphomes. Les allergies (arachide et venin d'hyménoptères) font aussi l'objet d'essais.

#### Le CIC de vaccinologie Cochin Pasteur [www.cicvaccinologie.com](http://www.cicvaccinologie.com)

Créé en 2005, c'est le seul centre d'investigation clinique français dédié à l'évaluation et au développement clinique de nouveaux vaccins. Il réalise des recherches biomédicales de nouveaux candidats vaccins à visée préventive ou thérapeutique, et permet l'investigation de nouvelles approches vaccinales issues de la recherche fondamentale.

Un tel CIC apporte beaucoup pour la mise en place d'essais sur les vaccins à ADN. Le personnel spécialisé, les locaux dédiés à la recherche clinique en vaccinologie, l'expérience dans l'obtention des autorisations, le circuit de traitement des déchets à risque rendent le développement de ces vaccins, classés OGM (directive européenne 98/81), plus aisé.

#### Exemple : un vaccin à ADN contre le VIH

Depuis les premiers vaccins à ADN testés contre le VIH chez l'homme (1998), l'essai de phase I « EuroVacc 02 » consistant en un vaccin ADN en primoimmunisation et un vecteur poxvirus NYVAC utilisé en rappel, a montré que la stratégie de *prime-boost* est bien tolérée chez l'homme. Elle produit des réponses T de longue durée (réponses T présentes chez 70 % des vaccinés au bout de 72 semaines). Un essai EuroVacc 03/ANRS VAC 20 est en cours, entre autres au sein du CIC Cochin-Pasteur, afin de préciser cette efficacité potentielle en comparant l'immunogénicité et la tolérance de différentes formulations vaccinales chez des volontaires à faible risque d'infection.

Notre sponsor



Cette stratégie vaccinale est par ailleurs en cours d'évaluation contre le virus de l'hépatite B (phase II chez l'homme) ou le paludisme (stade pré-clinique).

### **Perspectives**

La faible immunogénicité semble pouvoir être contrebalancée, on l'a vu, par les stratégies *prime-boost*. La recherche de nouveaux plasmides et de nouveaux adjuvants pourrait aussi y contribuer. De plus, l'insertion d'épitopes multiples et le ciblage des cellules dendritiques permettra d'élargir et de stimuler la réponse immune.

## **Les vaccins à ADN Flap**

### **Pierre CHARNEAU**

Laboratoire Virologie moléculaire et vectorologie, Institut Pasteur, directeur scientifique de TheraVectys, Paris  
[charneau@pasteur.fr](mailto:charneau@pasteur.fr)

Theravectys, entreprise de biotechnologie issue de l'Institut Pasteur de Paris, développe une nouvelle génération de vaccins utilisant la technologie des « lentivirus à ADN Flap ». Son objectif principal est de développer une phase I-II de vaccination thérapeutique contre l'infection VIH.

### **Les lentivirus peuvent infecter les cellules non mitotiques**

Les lentivirus, qui sont des rétrovirus (virus à ARN) ont une propriété unique : ils sont capables d'infecter des cellules non mitotiques. En effet, l'ADN rétrotranscrit à partir de l'ARN viral dans le cytoplasme peut traverser la membrane nucléaire à travers les pores nucléaires. À l'inverse, tous les autres rétrovirus accèdent à la chromatine nucléaire, où s'intègre l'ADN rétrotranscrit, via un mécanisme qui dépend de la mitose et de la désagrégation de la membrane nucléaire qui se déroule alors.

Notre équipe a montré tout d'abord que la transcription inverse des lentivirus génère au centre du génome une structure à trois brins de 99 nucléotides appelée ADN Flap. Cette structure est nécessaire à la traversée de la membrane nucléaire pour permettre l'intégration sans mitose de l'ADN rétrotranscrit. Elle induit une maturation des complexes de réplication du virus : ceux-ci, en forme de capsid, sont transformés en complexes de préintégration d'une taille compatible avec leur passage dans le pore nucléaire. En revanche, les molécules d'ADN dépourvues de Flap restent coincées dans leur cage capsidique à l'extérieur du pore nucléaire.

En amont de cette traversée, existe un routage très rapide du complexe réplicatif viral depuis la membrane plasmique vers le noyau. Il implique différents moteurs cellulaires (microtubules puis filaments d'actine). C'est au niveau de la membrane nucléaire que se déroule la plus grande partie de la transcription inverse et, finalement, la formation de l'ADN Flap au centre du génome viral. Le Flap intervient ensuite à une deuxième étape pour interagir avec des facteurs protéiques « navette » qui entraînent le filament d'ADN viral à l'intérieur du noyau.

### **Quand la « flapologie » inspire la vectorologie**

Toutes ces études fondamentales ont une application directe en vectorologie et transfert de gène. Classiquement, préparer un vecteur rétroviral consiste à enlever tous les gènes des rétrovirus et à les remplacer par une unité transcriptionnelle d'intérêt (on ne garde que les séquences cis-actives nécessaires à l'intégration et à la transcription inverse) ; les facteurs viraux indispensables à l'ensemble des étapes précoces du cycle viral sont inclus dans des systèmes dits d'encapsulation.

La première génération de vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 suivait ce schéma : on enlevait les séquences centrales qui gouvernent la formation de l'ADN Flap au cours de la transcription inverse. Nous avons donc réinséré l'ADN Flap dans un vecteur lentiviral de première génération et montré dans des systèmes tissulaires différents que l'on obtenait une stimulation intense du transfert de gène par rapport à des vecteurs dépourvus de Flap.

Cela s'est vérifié aussi pour les cellules dendritiques, des cellules professionnelles de présentation des antigènes. L'intégration stable de l'ADN transféré par le vecteur Flap dans ces cellules permet une

Notre sponsor



présentation d'antigène par la voie dite endogène, durant toute la vie de la cellule dendritique. C'est ce qui explique que l'on ait pu obtenir des réponses cellulaires intenses, diversifiées avec présence de lymphocytes T mémoire.

### **Vers un essai de phase I-II contre le VIH-1**

Nous travaillons depuis cinq ans sur un essai clinique de phase I-II de vaccin thérapeutique contre l'infection par le VIH. Dans un premier temps, nous avons utilisé des modèles murins humanisés ou sauvages. Plus récemment, en collaboration avec l'équipe de Roger Legrand (CEA), nous avons mené une étude de protection contre l'infection par le SIV chez le macaque. Cette étude a montré des résultats de protection, en termes de diminution de la charge virale et de préservation du compartiment cellulaire T4, très prometteurs.

### **Pour en savoir plus**

Dossier Paris Développement Infectiologie

<http://www.parisdeveloppement.com/la-technopole-parisienne/3-poles-innovants/pole-sante/actualites-du-pole-sante/dossiers-dactualites-sante/dossier-infectiologie-2007.html>

## **Discussion**

### **Eric Le Cam**

Ces différentes présentations illustrent la problématique de la vectorisation à des niveaux différents. Les deux premières évoquaient de petites molécules relativement faciles à vectoriser. La surprise vient surtout des deux dernières approches : les vaccins à ADN s'appuient sur une démarche pragmatique où l'on avance sans bien connaître les mécanismes de ciblage des cellules et les risques d'intégration ou de recombinaison dans le génome, ni les machineries complexes probablement en jeu. Les vaccins à ADN Flap s'appuient sur la connaissance précise des étapes préalables à l'entrée de l'ADN viral dans le noyau, même si l'on n'a pas identifié la machinerie nucléoprotéique qui fait entrer l'ADN rétrotranscrit. D'où ma question : l'ADN rétrotranscrit est-il réellement intégré dans le génome de la cellule ? Connaît-on les mécanismes qui sont en jeu à l'intérieur du noyau ?

### **Pierre Charneau**

La situation est bizarrement différente entre un virus et un vecteur sans que l'on comprenne bien pourquoi. Lors d'une infection virale, 50 % des molécules d'ADN s'intègrent et s'expriment. Chez les rétrovirus, l'intégration du génome est requise pour leur expression. Avec un vecteur lentiviral, on a la même bipartition classique entre ADN intégré et non intégré. Les molécules qui ne s'intègrent pas se circularisent sous forme de « cercles à un ou deux LTR ». Alors que ces cercles ne sont pas des matrices de transcription pour le virus, ils sont relativement bien transcrits lorsqu'ils proviennent de vecteurs. Du coup, on peut générer des vecteurs non intégratifs pour certaines applications.

### **Une intervenante dans la salle**

Il existe des recherches sur la vaccination par ARN nu, réalisées notamment en Allemagne (et à l'Institut de virologie de Vienne, NDLR). Ils auraient l'avantage de ne pas s'intégrer dans le génome de l'hôte.

### **Marie-Louise Michel (Institut Pasteur)**

Il faut mettre un bémol sur le risque d'intégration des vaccins ADN dans le génome hôte. Même chez l'animal le nombre de séquences intégrées que l'on a pu trouver est de l'ordre de  $10^{-6}$ , ce qui est très faible. Par ailleurs, on a activement recherché des anticorps anti-ADN dans la trentaine d'essais vaccins à ADN conduits chez l'homme (VIH, hépatite B, paludisme, dengue récemment), sans en trouver. Ces anticorps ont été détectés en fait chez des souris prédisposées à développer des maladies auto-immunes. Enfin, il faut savoir que Pfizer s'est engagé dans le domaine des vaccins à ADN en achetant en octobre 2006 PowderMed, une société britannique spécialisée dans la recherche sur ce type de vaccins.

## **Où en est actuellement Theravectys ?**

### **Pierre Charneau**

Notre sponsor



La société a été créée en décembre 2006. Elle compte aujourd'hui sept salariés, une douzaine en fait avec les stagiaires. Le vrai départ d'activité a eu lieu depuis un an avec la démonstration chez la souris de la preuve de concept vaccinal pour plusieurs pathologies : VIH, virus du Nil occidental, mélanome. Notre implantation à Pasteur BioTop facilite les échanges scientifiques avec des laboratoires de l'Institut Pasteur et les transferts de technologies depuis le laboratoire de virologie fondateur. Enfin, notre propriété intellectuelle à base de licences exclusives d'utilisation nous autorise une liberté d'exploitation très favorable, et des visées futures pour l'attribution de sous-licences.

## **Avez-vous eu des difficultés à convaincre les investisseurs ?**

### **Pierre Charneau**

Aujourd'hui, les vecteurs lentiviraux impliqués dans l'immense majorité des essais de thérapie génique intègrent tous l'ADN Flap. La technologie n'est donc pas marginale. L'application vaccinale portée par Theravectys découlait logiquement de la propriété biologique fondamentale de ces vecteurs à s'intégrer dans des cellules non mitotiques telles que les cellules dendritiques. Elle était donc relativement facile à « faire passer ». Dans le détail, il se trouve que le conseil scientifique de l'investisseur principal de la société est un immunologiste qui a très vite compris l'intérêt de la technologie. D'autant que beaucoup d'équipes renommées, comme celle de David Baltimore, s'intéressent aux applications vaccinales des vecteurs lentiviraux. Ma conviction est que l'on peut générer des réponses anticorps avec des approches plus simples, mais que pour générer des réponses cellulaires, nécessaires dans le cas des pathologies à VIH, VHC, VHB, et du paludisme, les vecteurs ADN Flap sont les mieux placés.

### **Eric Le Cam**

La technologie Flap n'est pas sans lien avec les DNA baits de DNA Therapeutics. Les ADN Flap sont connus comme des intermédiaires reconnus par les structures de réplication et de réparation. Il existe donc probablement, entre l'ADN Flap et le piégeage de la réparation, des mécanismes proches qui sont acteurs des machineries nucléaires.

### **Estelle Habert-Ortoli, Paris Développement**

Pensez-vous que l'arrêt, en septembre 2007, de l'étude de phase II de Merck sur un vaccin adénoviral contre l'infection par le VIH (étude V520), par suite d'une suspicion de facilitation de l'infection chez certains patients, puisse avoir un impact négatif sur le développement de vaccins thérapeutiques ?

### **Pierre Charneau**

La facilitation de l'infection a été constatée chez un sous-groupe de patients qui avaient une préimmunité anti-adénovirus 5. Par quel mécanisme ? Mystère. En fait, cet essai n'aurait jamais dû démarrer car les tests de protection contre le SIV, chez des macaques triés pour certains CMH favorables au contrôle de l'infection, n'avaient montré qu'une faible réduction de la charge virale et aucune protection chez les macaques sauvages.

### **Roger Legrand, CEA**

L'échec de cet essai est le fait de la méthodologie utilisée. Il est très difficile de dire si le concept d'induction d'une réponse T protectrice contre le VIH est remis en cause par cet essai et si l'utilisation d'un vecteur adénoviral est elle aussi à revoir. C'est le concept de phase IIb qui est discutable. Pour le VIH, si l'on veut disposer d'un critère minimal d'efficacité, il est en effet nécessaire de passer de 200 individus en phase II à un essai de phase III réunissant plus de 15 000 individus durant une période de 8 ans. Un essai de phase IIb avec une population non représentative de la réalité des groupes exposés ne peut produire des résultats satisfaisants. Sur l'infection à VIH, on ne pourra pas faire l'économie d'essais de phase III très coûteux et difficiles à mettre en œuvre.

### **Pierre Charneau**

Pour un industriel, sans parler d'une start-up, ces essais réunissant un nombre restreint de patients sont cependant nécessaires car il lui est impossible de monter des essais aussi gigantesques et longs.

Notre sponsor



-----

**Prochaine Transversale Santé :**  
**Biomarqueurs, Pharmacogénomique et Nouvelles  
avancées en diagnostic**

Le 15 avril 2008 à 18h30  
Medicen, 6 rue Alexandre Cabanel  
Paris 15

[\[Inscription\]](#)

<http://www.parisdeveloppement.com/la-technopole-parisienne/3-poles-innovants/pole-sante/les-transversales-sante/inscription.html>

-----

Notre sponsor

