

Production d'érythropoïétine humaine : de nouvelles voies d'administration de cette hormone par thérapie génique

L'érythropoïétine (Epo), hormone glycoprotéique, est le facteur de croissance de la lignée érythrocytaire ; elle augmente la production, permet la maturation et inhibe l'apoptose des progéniteurs érythrocytaires (BFU-E, CFU-E) [1]. L'érythropoïétine recombinante humaine (hEpo) est actuellement utilisée pour le traitement des anémies rencontrées dans de nombreuses situations telles que les myélodysplasies, le traitement par l'AZT (Zidovudine®), la polyarthrite rhumatoïde. Son champ d'action principal reste l'anémie de l'insuffisant rénal chronique (*m/s* n° 4, vol. 3, p. 244). Dans cette indication, elle est utilisée sous forme intraveineuse ou sous-cutanée, avec la nécessité d'injections répétées trois fois par semaine. Plusieurs études ont précédemment montré que les myoblastes sont des cellules capables de produire des protéines recombinantes, et de maintenir leur concentration circulante à un niveau physiologique. Hamamori *et al.* à Los Angeles (CA, USA) [2] viennent de montrer que des myoblastes de souris transfectés avec le gène codant pour hEpo pouvaient produire de l'hEpo fonctionnelle, permettant d'obtenir une érythropoïèse efficace pendant trois mois. Les auteurs ont utilisé des cellules myogéniques C2 de souris qu'ils ont transfectées avec de l'hEpo ADNc associé à un promoteur et à une séquence stimulatrice du cytomégalovirus. Après avoir sélectionné le clone produisant le maximum d'Epo, ils ont injecté 4107 cellules à des souris C3H et des souris *nude* en différents sites musculaires. L'élévation de l'hématocrite apparaît dès la première semaine, avec un pic à la deuxième pour les souris C3H et à la cinquième semaine pour les souris *nude*, puis une phase de décroissance et un retour aux valeurs antérieures de l'hématocrite en cinq semaines pour les C3H et en trois mois pour les souris *nude*. La décroissance plus rapide de l'hématocrite chez les sou-

ris C3H est rattachée à des mécanismes immunologiques de rejet. Les auteurs signalent aussi le développement de nombreuses tumeurs (rhabdomyosarcomes) chez les souris *nude*. Néanmoins, cette étude montre que des myoblastes de souris transfectés permettent la délivrance de quantités suffisantes d'Epo pour promouvoir une érythropoïèse efficace et durable.

Deux autres équipes, l'une française (Descamps *et al.*, des laboratoires de W. Vainchenker et M. Perricaudet à Villejuif et de Y. Beuzard à Créteil) [3], l'autre américaine (Triparthy *et al.*, des équipes de E. Goldwasser et J. Leiden, Chicago, IL) [4], ont utilisé un vecteur adénoviral recombinant contenant le gène d'Epo. Pour l'équipe française, la voie d'administration intraveineuse se révéla la plus efficace, aboutissant à une élévation de l'hématocrite prolongée plus de six mois à condition qu'une forte quantité de virus (5×10^9 et 10^{10}) soit injectée [3]. La voie d'administration intramusculaire était moins efficace, à moins que le muscle de la souris adulte traitée ne fût préalablement lésé par électrocoagulation afin d'engendrer une régénération à partir des cellules satellites [3]. Entre les mains de l'équipe américaine, l'injection unique par voie intramusculaire d'un adénovirus défectueux codant pour le gène de hEpo permettait d'obtenir des concentrations plasmatiques physiologiques d'hEpo et une élévation stable de l'hématocrite pendant 120 jours. Ces auteurs ont injecté des doses croissantes du vecteur adénoviral par voie intramusculaire chez des souris nouveau-nées et des souris SCID (ayant un déficit immunitaire combiné sévère), et ont montré que l'hématocrite s'élevait dès la première semaine, et que cette élévation persistait jusqu'au 120^e jour. Cette élévation de l'hématocrite est proportionnelle à la concentration de virus injecté. Par ailleurs, les concentrations plasmatiques d'hEpo mesu-

rées par une technique ELISA sont aussi proportionnelles à la concentration de virus injecté. Après sacrifice des souris, le virus recherché par PCR n'a pu être localisé qu'au site d'injection, dans les myoblastes. Il n'a pas été noté de réaction inflammatoire que l'on puisse rapporter à l'adénovirus.

Cette étude montre que l'injection intramusculaire d'adénovirus peut être utilisée, sans effet secondaire majeur, pour la production, dans la circulation, de protéines recombinantes ; elle permet, en outre, d'obtenir des concentrations physiologiques et stables de la protéine pendant une période assez longue. Les injections intramusculaires ou intraveineuses d'adénovirus recombinés sont techniquement plus faciles que l'implantation autologue ou hétérologue de myoblastes transfectés ; elles semblent plus efficaces et ne semblent engendrer ni réponse inflammatoire ni tumeur chez la souris. Une autre voie d'administration d'érythropoïétine synthétisée sous le contrôle d'un transgène est constituée par les organoïdes [5], néo-organes constitués d'un support de fibres synthétiques et de collagène et ensemencés avec des fibroblastes infectés par des rétrovirus recombinants. Cette stratégie a été utilisée par l'équipe de J.M. Heard et O. Danos (Institut Pasteur, Paris), en collaboration avec l'équipe d'Y. Beuzard [6], avec d'excellents résultats quant à la production d'érythropoïétine sur une longue période et l'effet sur l'hématocrite.

Ces différents résultats montrent qu'il est possible de faire produire par thérapie génique, pour une longue période, une protéine recombinante active par voie sanguine, et que cette méthode a toutes les chances d'être très efficace lorsque cette protéine – hormone, cytokine, facteur de croissance – est active à faible concentration. L'efficacité biologique dans le cas du déficit d'autres

facteurs sanguins, par exemple protéines de la coagulation sanguine, nécessitera un gain « quantitatif » qui ne semble pas hors de portée.

C.C., J.P.G., A.K.

1. Varet B, Casadevall N, Lacombe C. L'érythropoïétine. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 366-72.
2. Hamamori Y, Samal B, Tian J, Kedes L. Persistent erythropoiesis by myoblast transfer of erythropoietin cDNA. *Hum Gene Ther* 1994 ; 5 : 1349-56.
3. Descamps V, Blumenfeld N, Villeval JL, Vainchenker W, Perricaudet M, Beuzard Y. Erythropoietin gene transfer and expression in adult normal mice: use of an adenovirus vector. *Hum Gene Ther* 1994 ; 5 : 979-85.
4. Tripathy SK, Goldwasser E, Lu M, Barr EM, Leiden J. Stable delivery of physiologic levels of recombinant erythropoietin to the systemic circulation by intramuscular injection of replication-defective adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 11557-61.
5. Danos O, Moullier P., Heard JM. Reimplantation de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 208-10.
6. Naffakh N, Henri A, Villeval JL, Rouyer-Fessard P, Moullier P, Blumenfeld N, Danos O, Vainchenker W, Heard JM, Beuzard Y. Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically-modified skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 (sous presse).

■■■ BRÈVE ■■■

■■■ Le gène d'un canal chlore rénal, gène candidat pour la maladie de Dent. La maladie de Dent est une maladie tubulaire rénale, héréditaire liée à l'X, caractérisée par un syndrome de Fanconi incomplet, une hypercalciurie, une néphrocalcinose, une lithiase urinaire et parfois une insuffisance rénale [1]. Le gène responsable a été localisé en Xp11.22 et les sujets atteints ont une microdélétion de moins 515 kb incluant le *locus* hypervariable DXS 255. Fisher *et al.* (Oxford et Londres, GB) ont construit un YAC de 185 kb contenant DXS 255 pour cribler une banque d'ADNc de rein adulte afin d'isoler des transcrits correspondant à la région qui englobe la microdélétion [2]. Deux clones ont été ainsi identifiés. Un transcrit de 9,5 kb est exprimé de façon prédominante dans le rein. L'analyse de sa séquence a identifié un cadre ouvert de lecture de 780 pb qui représente probablement l'extrémité 3' du gène ; la séquence en acides aminés de la protéine déduite a une grande similitude avec celle des canaux chlorure dépendants du voltage (CIC), et notamment CIC-N4, récemment reconnu, exprimé dans le muscle, le cerveau et le cœur et codé par un gène localisé en Xp22.3. Le gène en cause dans la maladie de Dent est baptisé *hCIC-K2*. Un fragment de 4,4 kb, détecté par l'un des clones, était complètement absent chez un malade atteint, confirmant que la délétion comprend au moins une partie du gène *hCIC-K2*. La perte d'activité de *hCIC-K2* (différent du gène *CIC-K1* exprimé dans le rein de rat) pourrait expliquer les anomalies de fonction du tube rénal proximal (ou syndrome de Fanconi).

[1. Wrong OM, *et al.* *QJ Med* 1994 ; 87 : 473-93.]

[2. Fischer SE, *et al.* *Hum Mol Genet* 1994 ; 11 : 2053-9.]