

Thérapie génique et maladies cardiovasculaires

Emmanuel Teiger
Marc Eloit
Isabelle Déprez
Chohreh Partovian
Jean-Luc Dubois-Randé
Patricia Lemarchand
Serge Adnot

Le système cardiovasculaire représente un domaine d'application de la thérapie génique à court et à moyen terme, notamment en ce qui concerne le traitement des complications de la maladie athéromateuse. Les progrès les plus avancés concernent la stimulation de l'angiogenèse au cours des maladies ischémiques. L'amélioration fonctionnelle et clinique obtenue récemment après transfert du gène du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) chez des patients atteints d'artérite ischémique des membres inférieurs offre de nouvelles perspectives thérapeutiques. Le transfert de gène utilisé dans le traitement de la resténose postangioplastie reste à l'heure actuelle prometteur malgré l'absence d'application clinique. Les mises en pratique de la thérapie génique à d'autres problématiques cardiovasculaires apparaissent plus lointaines, conditionnées par une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques ainsi que par l'amélioration des techniques de transfert de gène.

ADRESSES

E. Teiger : *maître de conférences des universités, praticien hospitalier de physiologie*. I. Déprez : *docteur en pharmacie, étudiante en thèse*. C. Partovian : *attaché hospitalo-universitaire*. S. Adnot : *professeur des universités, praticien hospitalier de physiologie*. Service de physiologie et d'explorations fonctionnelles et Inserm U. 492, Hôpital Henri-Mondor, 51, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 94010 Créteil, France. M. Eloit : *docteur vétérinaire, professeur de virologie*. Unité de génétique moléculaire, École nationale vétérinaire d'Alfort, 7, avenue du Général-de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France. J.L. Dubois-Randé : *professeur des universités, praticien hospitalier de cardiologie*. Service de cardiologie et Inserm U. 400, Hôpital Henri-Mondor, 51, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 94010 Créteil, France. P. Lemarchand : *maître de conférences des universités, praticien hospitalier de biologie cellulaire*. Inserm U. 25, Faculté de médecine Necker-Enfants Malades, 161, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

Les maladies cardiovasculaires représentent toujours la principale cause de mortalité dans les pays développés. Malgré les progrès réalisés ces dernières années en termes de prévention et de prise en charge de leur complications, de nombreux aspects restent non résolus. Pour certains, la thérapie génique se situe comme une voie de recours envisageable à très court terme. C'est le cas notamment des maladies ischémiques évoluées dépassant les possibilités existantes de revascularisation par dilatation artérielle ou pontage chirurgical. La stimulation de l'angiogenèse par l'administration de gènes codant pour des facteurs angiogéniques dans ces situations représente une nouvelle approche qui a déjà conduit à plusieurs essais cliniques [1, 2]. Un autre domaine d'application de la thérapie génique est représenté par le traitement de la resténose postangioplastie. Le caractère focal et limité dans le temps de ce processus pathologique, de même que l'accessibilité de la paroi artérielle par voie endovasculaire, expliquent les succès obtenus dans de nombreux travaux expérimentaux ciblant des gènes variés. Bien que faisant encore l'objet de discussion [3, 4], les premiers essais cliniques viennent de débiter. A côté de ces aspects thérapeutiques concernant principalement les complications de la maladie athéromateuse, d'autres applications possibles

de la thérapie génique sont l'objet d'une recherche à plus long terme. C'est notamment le cas de maladies graves telles que certaines formes d'insuffisance cardiaque, l'hypertension artérielle pulmonaire, dont la gravité à court terme et l'absence de thérapeutique en dehors de la transplantation justifient le développement de nouvelles approches thérapeutiques spécifiques.

Un autre domaine d'application concerne les maladies génétiques héréditaires à expression cardiovasculaire, certaines formes d'hypercholestérolémie, de maladies spécifiques du muscle cardiaque ou d'anomalies de l'hémostase. L'abord thérapeutique de ces maladies se heurte ici aux problèmes généraux d'une thérapie génique substitutive, principalement représentés par les trop faibles efficacité et durée d'expression du transgène.

Problèmes généraux liés aux modalités de transfert, vectorologie dans le système cardiovasculaire

Certaines particularités du système cardiovasculaire conditionnent les modalités de transfert de gène ou de vectorisation utilisables. Parmi ces caractéristiques, la relative accessibilité de la paroi vasculaire à un traitement administré localement, la possibilité d'obtenir des effets thérapeutiques malgré une brève durée d'expression du transgène (stimulation de l'angiogenèse) ont conduit à l'utilisation d'ADN nu aussi bien qu'à l'utilisation de vecteurs viraux. Les différentes modalités d'administration de ces vecteurs sont résumées dans la *figure 1*.

Utilisation d'ADN plasmidique ou de vecteurs non viraux

L'utilisation d'ADN nu est en principe limitée par la faible efficacité de transfection et donc par un faible niveau d'expression du transgène (*Tableau I*). Ces caractéristiques sont cependant à nuancer en fonction du type de cellules transfectées et de la nature du transgène. Administré par voie intraveineuse, l'ADN plasmidique subit une dégradation très rapide au niveau du système réticulo-

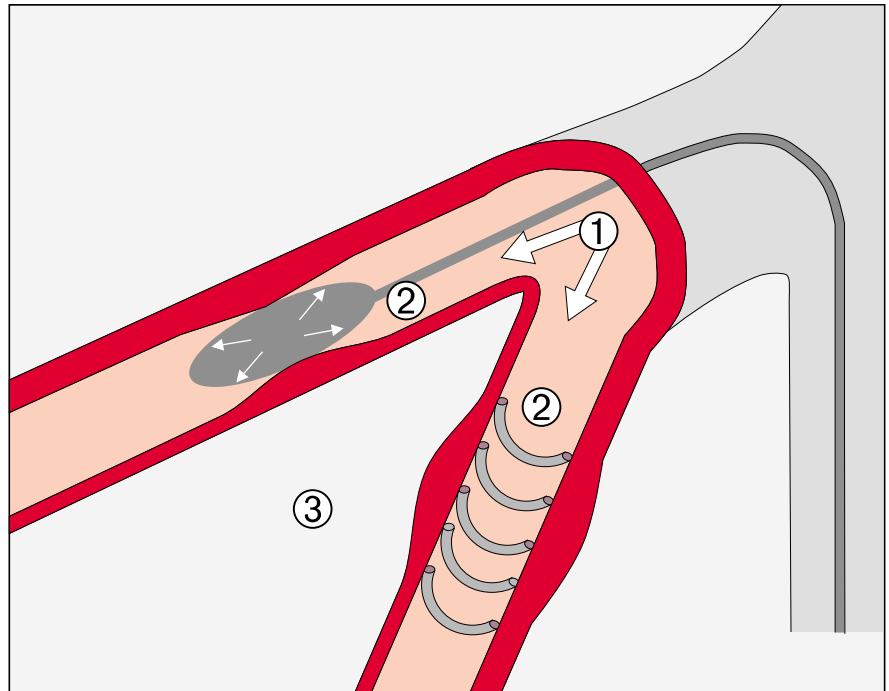


Figure 1. **Modalités de délivrance d'un gène dans le système cardiovasculaire.** 1. Injection intravasculaire, principalement utilisée dans le cœur (injection intracoronaire), destinée à stimuler l'angiogenèse dans un territoire ischémique. 2. Administration dans la paroi artérielle, réalisable par l'intermédiaire des nouvelles techniques de cathétérisme permettant l'accès à la paroi artérielle par voie percutanée, utilisée dans la prévention de la resténose postangioplastie ou dans la stimulation de l'angiogenèse. 3. Administration directe du vecteur ou du transgène dans le tissu (muscle, myocarde, péricarde), utilisée principalement dans la stimulation de l'angiogenèse.

endothélial et a une demi-vie plasmatique très courte [5]. En revanche, une expression locale du transgène peut être induite après administration d'ADN plasmidique directement dans les tissus. De façon intéressante, l'administration des gènes dans les muscles squelettiques ou cardiaques donne les meilleurs résultats en termes de rendement d'expression (quantité de protéine produite). Malgré un faible taux de transfection, l'expression du transgène dans le muscle peut durer plusieurs mois sans réplication ni intégration apparente du plasmide injecté. Ces avantages ont été largement mis à profit pour stimuler l'angiogenèse. L'administration d'un plasmide contenant l'ADN complémentaire du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) dans le muscle ou la paroi vasculaire a permis d'obtenir une expression locale de la protéine ainsi qu'une augmentation des concentrations circulantes de VEGF, observée jusqu'à 15 jours après l'administration [6]. Les avan-

tages et les inconvénients liés à l'utilisation d'un plasmide sont résumés dans le *Tableau I*. Un avantage supplémentaire à l'utilisation de plasmide est sa relative simplicité. Ainsi, dans l'étude de Baumgartner *et al.*, le plasmide contenant l'ADN du VEGF avait été préparé dans le laboratoire universitaire de l'équipe responsable du projet sans intervention d'un partenaire industriel [6].

Vecteurs viraux

Les vecteurs adénoviraux sont les plus couramment utilisés dans le transfert de gène *in vivo* appliqué au domaine cardiovasculaire du fait de leur capacité à transduire des cellules postmitotiques. L'efficacité de transfection d'un vecteur adénoviral est de l'ordre de 100 fois supérieure à celle d'ADN plasmidique. Cependant, en raison de l'absence d'intégration chromosomique, l'information génétique transduite par les adénovirus est perdue au cours des divisions cellulaires à la

Tableau I

AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES VECTEURS POTENTIELS DU TRANSFERT DE GÈNE
DANS LE DOMAINE CARDIOVASCULAIRE

	Adénovirus	Virus adéno-associé	Plasmide
Capacité d'insertion	De 7 à 37 kb en fonction des délétions réalisées dans le génome	Environ 4-5 kb	Pas de limitation théorique de taille
Efficacité de transduction	Élevée dans la plupart des types cellulaires	Élevée dans certains types cellulaires (fibres musculaires, neurones, hépatocytes)	Faible
Inflammation	De faible à élevée en fonction des délétions réalisées dans le génome	Faible	Faible
Expression du transgène	De faible à élevée en fonction de l'association promoteur/vecteur/cellule hôte	De faible à élevée en fonction de l'association promoteur/cellule/hôte	Faible
Durée de persistance du transgène	De faible à élevée en fonction des délétions réalisées dans le génome	Élevée	Élevée
Modifications de la spécificité cellulaire	Ciblage possible par modifications de la fibre et/ou de la protéine de base du penton	Non réalisée à ce jour	Théoriquement possible
Administrations répétées	Efficacité limitée Possibilité d'utiliser différents sérotypes	Semble possible mais résultats contradictoires	Oui

différence des rétrovirus et de l'AAV (*adeno-associated virus*, un parvovirus) qui intègrent leur acide nucléique dans le génome de la cellule hôte. Néanmoins, l'utilisation des rétrovirus est limitée du fait de leur capacité de ne transcrire que les cellules en cours de division. L'AAV possède un spectre de cibles tissulaires limité aux cellules musculaires lisses et aux neurones (Tableau I).

Le principal défaut du vecteur adéno-viral est sa propension à déclencher, chez l'hôte, une forte réaction immunitaire, tant humorale que cellulaire, due à l'expression résiduelle de protéines virales. La conséquence en est une réduction de l'expression du transgène par élimination des cellules transduites en quelques semaines. Par ailleurs, à forte concentration, les vecteurs adéno-viraux peuvent avoir des effets toxiques directs sur les cellules, et ainsi reten-

tir sur la fonction de l'organe cible, qu'il s'agisse de la paroi vasculaire ou des cellules pulmonaires. Les vecteurs adéno-viraux ne semblent pas affecter la contraction myocardique.

Stimulation de l'angiogenèse dans les maladies ischémiques

Les complications ischémiques représentent l'évolution habituelle des maladies dégénératives vasculaires, et plus particulièrement de la maladie athéromateuse. En cas d'ischémie chronique du myocarde ou des membres inférieurs, un des moyens utilisés par l'organisme pour améliorer la perfusion du territoire atteint est le développement d'une circulation collatérale de suppléance (*figure 2*). Celle-ci, issue d'artères de voisinage encore perfusées, réalise un

véritable réseau de suppléance dirigé vers le territoire ischémique. C'est ainsi qu'au niveau des artères coronaires, où l'occlusion siège habituellement à la partie proximale des gros troncs artériels, le développement d'une circulation collatérale à partir d'une autre artère est un phénomène fréquent, permettant de limiter l'importance du déficit de perfusion. L'objectif de l'angiogenèse thérapeutique est d'amplifier ce phénomène également appelé « artériogenèse » dont le mécanisme reste mal compris [7].

L'angiogenèse, les facteurs angiogéniques

L'angiogenèse se définit par la formation de nouveaux capillaires à partir de petits vaisseaux préexistants. Ce processus d'angiogenèse résulte d'une réponse des cellules endothé-

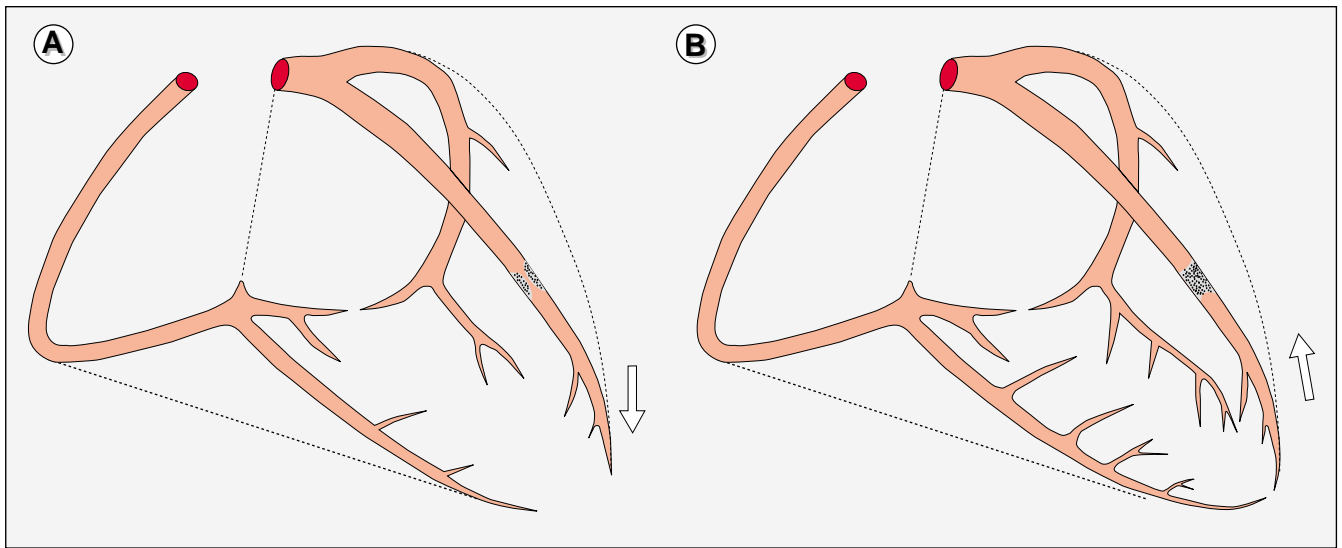


Figure 2. **Développement d'une circulation collatérale de suppléance dans la circulation coronaire.** La constitution progressive d'un rétrécissement sur une des artères principales (ici l'artère interventriculaire antérieure) peut s'accompagner de l'ouverture de collatérales préexistantes et/ou d'une angiogenèse à partir des autres troncs artériels permettant la prise en charge de la circulation d'aval dans la zone hypovascularisée (ici à partir de la coronaire droite). L'angiogenèse thérapeutique consiste à stimuler ce processus physiologique par l'administration de facteurs de croissance angiogéniques.

liales à des signaux spécifiques. Les étapes impliquées comportent la fragmentation de la membrane basale entourant le vaisseau sanguin existant, la migration des cellules endothéliales vers la source du signal, leur prolifération, puis leur arrangement en tube vasculaire. Parmi les nombreux facteurs capables d'activer l'angiogenèse, seuls certains comme le VEGF et les FGF (*fibroblast growth factor*) sont capables de provoquer l'ensemble des composantes de la réponse angiogénique *in vitro* et *in vivo* [8, 9]. C'est donc surtout vers l'utilisation de VEGF ou de FGF que se sont tournés les essais de thérapeutique angiogénique, après quelques essais utilisant l'héparine, dont l'une des actions est de permettre la libération de FGF endogènes à partir de la matrice extracellulaire.

Les premières études expérimentales soutenant ce concept ont été réalisées dès 1992 par l'administration de FGF sous forme de protéine recombinante [1, 2]. Dans la plupart des modèles expérimentaux utilisés, une ischémie locale est induite par ligature d'une artère iliaque, fémorale ou coronaire. Une particularité de ces modèles est que l'ischémie ainsi

créée est elle-même responsable d'une réponse angiogénique associée au développement d'une circulation collatérale à partir des vaisseaux perfusés restants (artériogenèse). Dans ces modèles, l'administration de FGF ou de VEGF vient donc se superposer à un ensemble de processus endogènes, provoqués par l'hypoxie, dont le rôle permissif ou facilitateur apparaît fondamental.

De nombreuses études expérimentales ont ainsi montré l'efficacité d'une délivrance locale, intramusculaire ou intra-artérielle, de FGF ou de VEGF sous forme de protéines recombinantes [1, 2]. Chez les animaux traités, on note, dans les semaines suivant l'occlusion artérielle, une amélioration de la densité capillaire dans le territoire ischémique, une augmentation de la circulation collatérale évaluée par angiographie ainsi qu'une amélioration des débits artériels. Dans le myocarde, une amélioration de la fonction ventriculaire gauche est associée à ces indices de reperfusion [2]. Une première étude chez l'homme a récemment montré l'applicabilité de cette approche à la pathologie coronarienne. L'administration de FGF acide a été pratiquée directement

dans le myocarde au cours d'une intervention chirurgicale pour triple pontage coronarien chez une dizaine de patients. Le contrôle angiographique, réalisé 12 semaines après l'administration, montre une néovascularisation débordant la zone correspondant au lieu d'injection, située sous l'anastomose. On remarque surtout une revascularisation des artères coronaires en aval des sténoses par un flux rétrograde issu de la zone de revascularisation [10]. Selon un rapport préliminaire, l'administration intracoronaire de VEGF permettrait d'obtenir des résultats semblables.

Stimulation de l'angiogenèse par transfert de gène : « la thérapie génique angiogénique »

Les premières études expérimentales de transfert de gène dans les situations ischémiques ont utilisé un plasmide non vectorisé contenant l'ADN complémentaire du VEGF 165. Dans le modèle d'ischémie distale chez le lapin, l'administration de 100 mg de plasmide par voie intramusculaire, ou dans la paroi de l'artère fémorale en amont de l'occlusion, est suivie d'une amélioration des index de reperfusion [11]. Les trois isoformes

du VEGF testées dans ce modèle, VEGF 121, VEGF 165, et VEGF 189 démontrent le même niveau d'efficacité [11]. De façon surprenante, l'administration intramusculaire ou le dépôt de plasmide VEGF sur la paroi artérielle sont suivis dans les deux cas d'une augmentation du VEGF circulant qui persiste jusqu'au 5^e jour. Ainsi, l'utilisation d'ADN nu par voie intramusculaire ou intra-artérielle semble suffisante pour stimuler l'angiogenèse locale et augmenter le VEGF circulant pendant quelques jours. Ces données expliquent l'intérêt suscité par les vecteurs non viraux dans la stimulation de l'angiogenèse [2, 9].

La première tentative de « thérapie génique angiogénique » a eu lieu en 1996 chez un patient atteint d'artérite chronique oblitérante des membres inférieurs à un stade évolué (stades III/IV). La délivrance était réalisée par voie endovasculaire, le plasmide contenant l'ADN complémentaire du VEGF étant administré dans la paroi artérielle en amont de la zone d'occlusion [12]. L'amélioration fonctionnelle et angiographique notée à 12 semaines, de même que le développement d'angiomes stellaires et la constitution d'un œdème unilatéral au niveau du membre traité, démontraient clairement la présence d'une action angiogénique locale. La même équipe a récemment publié les résultats obtenus chez 9 patients atteints d'artérite chronique oblitérante des membres inférieurs après administration intramusculaire de plasmide contenant l'ADN complémentaire du VEGF 165, répétée à 15 jours d'intervalle [6]. Cet apport s'est traduit localement par une amélioration des critères de perfusion angiographiques et hémodynamiques, une diminution de la douleur, une cicatrisation des ulcères cutanés. Une augmentation de la concentration de VEGF circulant était notée 1 à 2 semaines après l'administration du plasmide, simultanément au développement d'un œdème du membre inférieur transitoire chez certains patients. Il est notable que, dans cette étude clinique, la voie intramusculaire était utilisée alors que les études préalables de faisabilité avaient utilisé l'injection intra-artérielle. Les raisons ayant conduit à modifier le mode d'injec-

tion ne sont pas explicitées. L'innocuité de l'administration intra-artérielle du plasmide contenant l'ADN complémentaire du VEGF 165 avait cependant été montrée expérimentalement, le VEGF transduit accélérant la réparation de l'endothélium et permettant une meilleure récupération de son activité fonctionnelle [13].

En ce qui concerne l'application à la circulation coronaire, des résultats préliminaires viennent récemment d'être présentés sous forme de communications au congrès de l'*American Heart Association* en 1998. L'administration d'ADN plasmidique du VEGF a été réalisée selon plusieurs voies, dans la paroi des artères coronaires ou directement dans le muscle cardiaque par minithoracotomie. L'injection intramyocardique du gène du VEGF 121 vectorisé dans un adénovirus EI-/E3⁻ a également été réalisée chez plusieurs patients en chirurgie cardiaque, en complément des pontages coronaires dans les zones non pontables sans que soient notées de complications affectant le muscle cardiaque ou le péricarde. On assiste donc actuellement au développement accéléré de ce type d'approche thérapeutique. A la suite des études de phase I, la réalisation d'études contrôlées dans un futur proche devrait permettre de mieux préciser le bénéfice réel obtenu par la thérapie génique dans ces situations pathologiques ainsi que de définir les meilleures modalités d'administration.

Les interrogations qui subsistent

Administrer la protéine u un transgène ?

La présence très brève du facteur angiogénique dans un territoire ischémique semble suffisante pour induire le développement d'une circulation collatérale. Il apparaît cependant plus logique de favoriser l'expression d'un transgène dans l'organe cible plutôt que d'y administrer la protéine qui majore le risque de dissémination, nécessite des administrations répétées et atteint des coûts de réalisation plus élevés.

Les effets induits sont-ils persistants ?

Les effets obtenus sont persistants à moyen terme. La circulation collaté-

rale développée ne semble pas régresser si un contrôle est effectué quelques semaines après le traitement [14]. Le bénéfice potentiel lié à la réexpression plus tardive du transgène reste à préciser.

L'action angiogénique est-elle circonscrite au territoire ischémique ?

L'administration des facteurs d'angiogenèse en dehors d'une situation d'hypoxie ou d'ischémie n'induit pas la formation de néovaisseaux [9]. La stimulation locale de l'angiogenèse semble donc être conditionnée ou favorisée par l'environnement hypoxique, ce qui explique la relative sélectivité d'action de ces facteurs [9]. Parmi les mécanismes invoqués, la surexpression des récepteurs spécifiques des facteurs angiogéniques, la surexpression du VEGF ou du bFGF (*basic fibroblast growth factor*), l'action synergique de ces facteurs [15], l'activation des métalloprotéases de la matrice extracellulaire de même que l'intervention de certains facteurs stabilisants comme les angiopoïétines sont sans doute déterminants.

Quel gène surexprimer ?

Les gènes d'intérêt potentiels concernent, outre le VEGF ou les FGF, certains facteurs de transcription comme le HIF-1 (*hypoxia-inducible factor*) ou certains de ses homologues, de même que les angiopoïétines 1 ou 2, qui contrôlent le recrutement ou l'apposition de cellules musculaires lisses dans la paroi des vaisseaux et ainsi favoriseraient plutôt l'« artériogenèse ». L'intérêt d'utiliser préférentiellement le VEGF à certaines formes du FGF reste encore débattu [16]: (1) à la différence des FGF, le VEGF agit de manière sélective sur les cellules endothéliales du fait d'une localisation quasi exclusive de ses récepteurs sur ces dernières; (2) le VEGF est le facteur angiogénique hypoxique, il est donc synthétisé de façon naturelle en conditions d'hypoxie ou d'ischémie; (3) les récepteurs du VEGF, notamment le récepteur KDR, sont surexprimés en situations d'hypoxie ou d'ischémie; (4) à la différence des FGF, la structure du VEGF comporte un peptide signal qui lui permet d'être sécrété; (5) le VEGF existe naturelle-

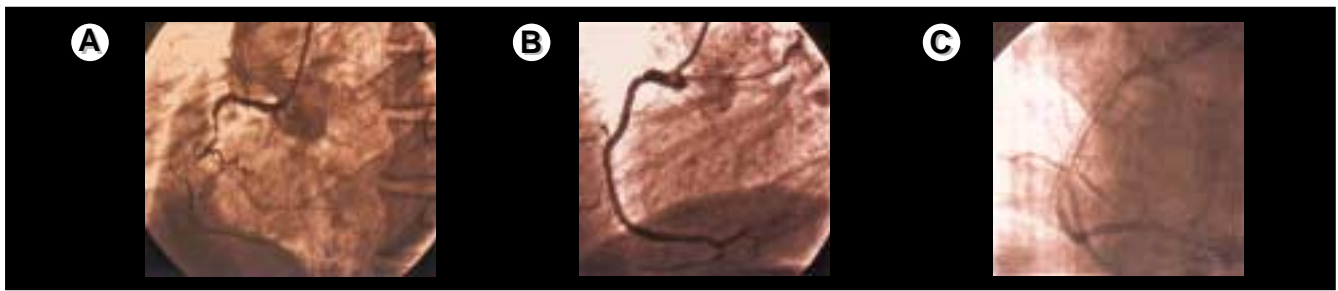


Figure 3. **Resténose intra-stent.** **A.** Sténose athéromateuse de la coronaire droite. **B.** Résultat après angioplastie au ballon et mise en place d'un stent. **C.** Aspect angiographique à 2 mois montrant une resténose intra-stent constituée d'une prolifération endoluminale.

ment sous forme soluble, notamment les isoformes les plus courtes VEGF₁₂₁ et VEGF₁₆₅; (6) le VEGF stimule l'expression de la NO synthase endothéliale ou, selon les conditions, active directement l'enzyme, ce qui lui confère une activité protectrice de la paroi vasculaire [17].

Stimuler l'angiogenèse ou « l'artériogenèse » ?

Le développement d'une circulation collatérale de suppléance reste le principal critère de succès dans l'évaluation d'une thérapeutique de reperfusion d'un territoire ischémié. Les mécanismes de cette « artériogenèse » restent méconnus. Ceux-ci se différencient des mécanismes de l'angiogenèse proprement dite car les vaisseaux concernés sont des artéioles (qui contiennent du muscle lisse dans leur paroi) et non des capillaires. Expérimentalement, seule la constitution d'une ischémie régionale permet, de façon prévisible, d'induire le développement d'une circulation collatérale. Une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'« artériogenèse » devrait permettre dans l'avenir de s'adresser de façon plus spécifique à cet aspect déterminant de la reperfusion d'un territoire ischémié [7, 18].

Y a-t-il des complications à attendre de la stimulation de l'angiogenèse ?

La dissémination dans l'organisme de facteurs angiogéniques comme le VEGF expose au risque de complications telles que le développement de tumeurs solides ou de rétinopathies. Si l'implication du VEGF dans la stimulation de l'angiogenèse tumorale ne fait aucun doute, il n'est, en revanche, pas prouvé qu'il soit capable d'accélérer la

croissance tumorale et l'apparition de métastases lorsqu'il est véhiculé par voie sanguine [9]. De même, le développement d'une rétinopathie de type diabétique n'a pas été constaté dans les études cliniques ou expérimentales déjà réalisées. Enfin, une large surexpression de VEGF, et non de FGF peut potentiellement induire une hypotension artérielle. Ce dernier effet est directement dépendant de la voie d'administration du vecteur ainsi que de l'intensité de l'expression du transgène. Il représente cependant une sérieuse limitation à l'administration directe de la protéine et plaide donc en faveur de l'utilisation du transfert de gène.

Y a-t-il des situations pathologiques autres que l'ischémie pouvant bénéficier de cette approche thérapeutique ?

La stimulation de l'angiogenèse est potentiellement utilisable dans certaines situations telles que la greffe de lambeaux cutanés, la cicatrisation d'ulcère ou de plaies chirurgicales. Le transfert pulmonaire du gène du VEGF représente également une voie thérapeutique prometteuse de l'hypertension artérielle pulmonaire d'après les premiers résultats expérimentaux.

Resténose postangioplastie

L'angioplastie percutanée est actuellement la méthode de revascularisation la plus utilisée pour le traitement des maladies vasculaires coronaires ou périphériques (environ 60 000 procédures en France en 1997). La principale limite de cette technique est la survenue, dans les semaines suivant l'angioplastie, d'un processus de resté-

nose pouvant conduire dans 20 % à 40 % des cas à un nouveau rétrécissement responsable de la réapparition des symptômes cliniques. Deux mécanismes principaux sont responsables de ce phénomène de resténose : (1) la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la média artérielle conduisant à la constitution d'une néointima venant faire saillie dans la lumière vasculaire ; (2) un phénomène de remodelage constrictif conduisant à une diminution chronique du diamètre externe du vaisseau sans affecter l'épaisseur de celui-ci. A l'heure actuelle, aucune des approches pharmacologiques n'a permis de prévenir ce processus malgré la diversité des substances testées. La seule technique ayant permis d'obtenir une diminution significative du taux de resténose consiste à placer dans l'artère une endoprothèse (ou *stent*), sorte de ressort métallique permettant une contention mécanique. La généralisation de l'usage de ces endoprothèses a modifié la physiopathologie de la resténose, faisant disparaître pour l'essentiel le remodelage constrictif mais exacerbant les processus prolifératifs de la paroi artérielle [19]. Deux stratégies sont donc maintenant prometteuses : (1) développer des endoprothèses moins agressives pour la paroi artérielle pour diminuer la réponse hyperplasique ; (2) associer à la mise en place du *stent* une thérapeutique antiproliférative. Le passage à une thérapie génique antiresténose chez l'homme nécessite cependant la résolution de plusieurs problèmes.

L'identification des cibles thérapeutiques

Dans les modèles expérimentaux (carotide de rat, artère iliaque de

lapin, coronaire de porc), la composante proliférative est au premier plan, ce qui explique que les approches de thérapie génique aient été essentiellement axées sur les stratégies de blocage de la prolifération cellulaire. On peut distinguer les « stratégies cyostatiques » visant à bloquer l'entrée dans le cycle de division des cellules musculaires lisses, les « stratégies cytotoxiques » visant à détruire les cellules en division et les « stratégies paracrines » consistant à produire localement un facteur sécrété limitant la réponse proliférative pariétale. Les gènes utilisés avec succès pour ces différentes approches dans les modèles expérimentaux sont résumés dans le *Tableau II*. L'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires peut potentiellement exposer à des effets délétères. En théorie, le blocage de ces processus de réparation vasculaire pourrait ainsi favoriser la rupture de plaque, mécanisme essentiel à l'origine de l'angor instable et de l'infarctus du myocarde. Dans le cas de la problématique de la resténose après implantation d'un *stent*, où les phénomènes de prolifération sont au premier plan, la thérapie génique antiproliférative constitue une approche logique d'autant que l'endoprothèse permet une stabilisation mécanique de la paroi artérielle. Une stratégie paracrine utilisant le gène du VEGF 165 sous forme d'ADN nu pour accélérer la réendothélialisation fait l'objet de deux études cliniques de phase I, l'une aux États-Unis dans l'angioplastie périphérique, l'autre en Finlande dans l'angioplastie coronaire où le plasmide est associé à des liposomes. Le bénéfice clinique de cette approche reste à évaluer.

Les vecteurs de transfert restent imparfaits

Dans la problématique de la resténose, ce sont les vecteurs adénoviraux qui ont été le plus largement utilisés car ils remplissent une grande partie des caractéristiques recherchées, c'est-à-dire : (1) une bonne efficacité de transduction, surtout nécessaire pour les stratégies cyostatique ou cytotoxique ; (2) la capacité à transduire des cellules quiescentes (le taux de mitose dans la paroi arté-

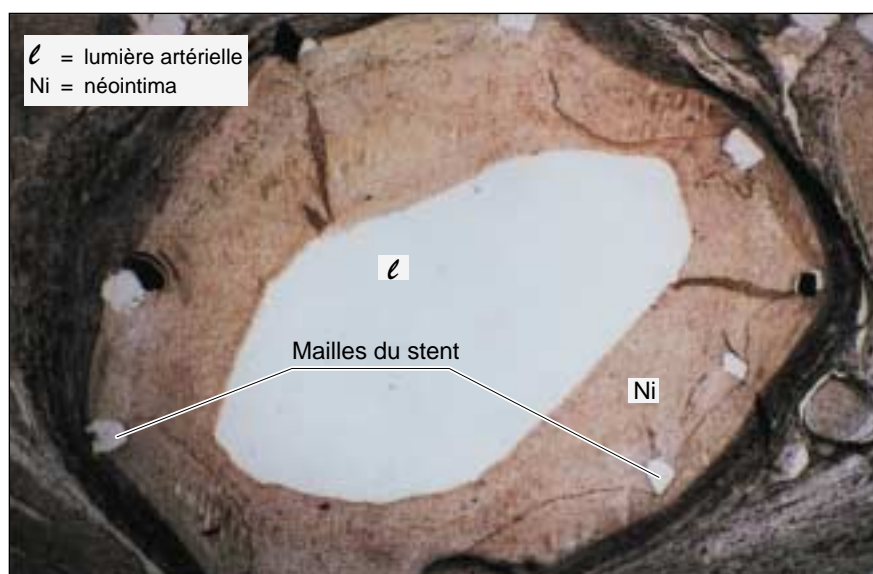


Figure 4. **Coupe histologique d'une coronaire de porc examinée 2 semaines après mise en place d'un stent. Prolifération néo-intimale constituée de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire.**

rielle est très faible). De plus, la durée d'expression de quelques semaines obtenue avec ces vecteurs est *a priori* suffisante pour l'effet recherché. Dans la plupart des modèles animaux sur artères saines, la vectorisation adénovirale permet d'obtenir une expression significative du transgène [20]. Il faut noter, cependant, que l'efficacité est nettement diminuée sur les artères athérosclérotiques [21] et qu'à forte concentration, les adénovirus sont susceptibles d'avoir des effets toxiques cellulaires et de modifier la physiologie artérielle [22] (*Tableau I*). L'utilisation de liposomes recouverts des protéines fusiogènes de la capsid du virus de Sendai permettent d'améliorer l'efficacité de transfert de gènes ou d'oligonucléotides antisens dans la paroi artérielle [23].

Les outils de cathétérisme pour la délivrance locale des vecteurs de thérapie génique dans la paroi artérielle restent à optimiser

L'accessibilité de la paroi artérielle par voie percutanée a constitué un des arguments en faveur de la faisabilité à court terme d'un transfert de gène vasculaire. Le développement de l'angioplastie coronaire a permis la mise au point de multiples systèmes de cathétérisme susceptibles

de permettre la délivrance locale de produits dans la paroi artérielle et potentiellement utilisables pour la thérapie génique. Les avantages et les inconvénients de ces différents cathéters ont fait l'objet de revues détaillées [24]. Globalement, la difficulté de l'administration locale dans le réseau coronaire résulte du fait qu'il est impossible d'interrompre de façon prolongée la circulation sanguine et que, par ailleurs, il existe de très nombreuses collatérales qui constituent autant de voies de dissémination à distance. Les systèmes fondés sur l'injection directe dans la paroi paraissent les plus adaptés pour l'administration d'adénovirus mais il n'existe pas actuellement de moyen de quantifier la quantité de vecteur viral effectivement présent dans la zone à traiter. De plus, ces différents outils de cathétérisme se sont montrés efficaces sur des artères saines, mais restent pour la plupart à évaluer sur artères athérosclérotiques.

Quels sont les patients susceptibles de tirer bénéfice d'une thérapie génique de la resténose ?

Seul un petit nombre de patients va présenter une resténose clinique, et il est vraisemblable que ce nombre va encore diminuer avec les développements du matériel et des stratégies de

Tableau II

LES DIFFÉRENTES STRATÉGIES DE THÉRAPIE GÉNIQUE
DE LA RESTÉNOSE ET LES GÈNES CANDIDATS
UTILISÉS DANS LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX [4]

Stratégie cytostatique (inhibition du cycle cellulaire)	Stratégie cytotoxique (destruction des cellules en division)	Stratégie paracrine
<p>Surexpression de protéines réglant le cycle cellulaire</p> <ul style="list-style-type: none"> - mutant constitutivement actif de la protéine Rb - mutant dominant négatif H-ras - protéine p21 inhibitrice des kinases dépendantes des cyclines - protéine gax, inhibitrice spécifique du cycle cellulaire des CML <p>Blocage de l'expression des protéines du cycle cellulaire par les oligonucléotides antisens</p> <ul style="list-style-type: none"> - antisens c-myc - antisens c-myb - antisens PCNA - anti cdk2 et cdc2 	<p>Enzymes d'origine virale ou bactérienne produisant un métabolite toxique en présence d'analogue de nucléotide</p> <ul style="list-style-type: none"> - thymidine kinase de l'<i>herpes simplex</i> + ganciclovir - cytosine désaminase + 5 fluorocytosine 	<p>Inhibition de la prolifération des CML</p> <ul style="list-style-type: none"> - NO synthase endothéliale - peptide natriurétique de type C <p>Action antithrombotique</p> <ul style="list-style-type: none"> - hirudine (antithrombine) <p>Accélération de la réendothélialisation</p> <ul style="list-style-type: none"> - VEGF-165

traitement. L'impossibilité de prévoir la survenue de cette resténose chez un patient donné impose les précautions propres à un traitement préventif qui sera inutile pour la majorité d'entre eux. Compte tenu des approches antiprolifératives développées expérimentalement, la resténose *intra-stent* paraît une population cible privilégiée d'autant qu'il est possible dans ce groupe d'identifier les sujets les plus à risque de resténose par le polymorphisme du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine [25]. Dans ce contexte, une thérapie génique de la resténose devra de toute façon être comparée aux autres approches antiprolifératives en cours de développement comme la radiothérapie endovasculaire.

Cas particulier des greffons veineux utilisés pour les pontages artériels

Cette indication particulière de la thérapie génique est assez proche sur le plan conceptuel de la resténose postangioplastie. Les greffons veineux utilisés lors des pontages sont soumis à un régime de pression artérielle entraînant une série de modifi-

cations structurales caractérisées par un épaississement progressif de la média et la formation d'une néointima qui sont à terme délétères. Dans le but d'améliorer leur fonctionnalité immédiate, plusieurs stratégies de modification par thérapie génique des greffons veineux avant leur implantation artérielle ont été développées. Le gène de VCAM soluble (*soluble vascular cell adhesion molecule*) a ainsi été proposé dans le but d'induire une compétition avec le VCAM présent à la surface des cellules endothéliales et de diminuer l'adhérence des monocytes circulants [26]. Une autre approche, visant à bloquer la prolifération des cellules musculaires lisses de la média veineuse par un oligonucléotide leurre dirigé contre le facteur de transcription E2F, est à l'heure actuelle en cours d'expérimentation clinique. Au total, si de nombreuses conditions semblent réunies pour faire *a priori* de la resténose une maladie susceptible de motiver rapidement des essais cliniques de thérapie génique, de nombreuses questions restent posées. Le fait qu'il s'agisse d'une maladie induite pour laquelle il existe des alternatives thérapeutiques

impose que toutes les précautions soient prises en termes d'innocuité et dans l'évaluation du rapport bénéfice/risque. Les résultats des deux essais cliniques, qui ont débuté avec le gène du VEGF 165, fourniront sans doute des éléments pour le débat qui agite actuellement le milieu cardiologique [3, 4].

Autres applications dans le domaine cardiovasculaire, perspectives

Comme dans les autres disciplines cliniques, c'est d'abord dans le cadre du traitement des maladies héréditaires que l'application de la thérapie génique a initialement été envisagée. Le premier protocole clinique a eu lieu aux États-Unis en 1993 sur des sujets présentant une hypercholestérolémie familiale [27] en rapport avec un déficit congénital en récepteurs de la lipoprotéine LDL. Les hépatocytes des sujets traités, obtenus après hépatectomie partielle, étaient transfectés par un vecteur rétroviral contenant le gène codant pour le récepteur des LDL (*low density lipoproteins*), puis réadministrés au patient

par injection dans la veine splénique. Le premier sujet traité a présenté une diminution rapide, de l'ordre de 20 %, de la concentration sérique de LDL, et une augmentation concomitante du taux de HDL (*high density lipoprotein*). La thérapie génique, dans ce cadre, se heurte aux mêmes difficultés que celles rencontrées pour le traitement par thérapie génique somatique de désordres héréditaires, c'est-à-dire essentiellement la difficulté de transduire un nombre suffisant de cellules pendant un temps suffisamment prolongé pour obtenir un effet physiologique, ainsi que l'impossibilité de répéter l'administration du transgène avec les vecteurs actuellement disponibles. De même, l'identification, ces dernières années, de certains des gènes responsables de maladies génétiques à expression cardiaque comme les cardiomyopathies hypertrophiques, les syndromes du QT long ou les cardiomyopathies liées à l'X [28] n'ouvre quelques perspectives pour une thérapie génique que dans un avenir encore éloigné. Un autre enjeu thérapeutique essentiel de la cardiologie, en dépit des progrès pharmacologiques, est l'insuffisance cardiaque qui constitue le terme évolutif de la plupart des affections cardiovasculaires. Les progrès de la génétique et de la biologie moléculaire laissent entrevoir plusieurs possibilités d'obtenir une augmentation de la masse des cellules contractiles cardiaques: (1) utiliser les facteurs de transcription musculaires de la famille MyoD pour différencier les fibroblastes présents dans les zones de fibrose en cellules contractiles; (2) tenter d'obtenir une entrée dans le cycle cellulaire des myocytes adultes; (3) greffer des cellules myocytaires néonatales ou des fibroblastes transformés à partir de cultures cellulaires [29] ■

RÉFÉRENCES

1. Ware JA, Simons M. Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nat Med* 1997; 2: 158-64.
2. Lee JS, Feldman AM. Gene therapy for therapeutic myocardial angiogenesis: a promising synthesis of two emerging technologies. *Nat Med* 1998; 4: 739-42.
3. De Young M, Dichek D. Gene therapy for restenosis: are we ready? *Circulation* 1998; 82: 306-13.

4. Baek S, March K. Gene therapy for restenosis. Getting nearer the heart of the matter. *Circulation* 1998; 82: 295-305.
5. Legendre J, Haensler J, Remy J. Les vecteurs non viraux de thérapie génique. *Med Sci* 1996; 12: 1334-41.
6. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97: 1114-23.
7. Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 1996; 79: 911-9.
8. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
9. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation* 1998; 97: 1108-10.
10. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors. *Circulation* 1998; 97: 645-50.
11. Takeshita S, Weir L, Chen D, et al. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227: 628-35.
12. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; 348: 370-4.
13. Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, et al. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation* 1996; 94: 3291-302.
14. Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, et al. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation* 1995; 91: 145-53.
15. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis *in vivo*. *Circulation* 1995; 92: 11365-71.
16. Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, et al. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation* 1996; 94: 1074-82.
17. Hood JD, Meiningner CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274: H1054-8.
18. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit limb. *J Clin Invest* 1998; 101: 40-50.

19. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker A. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans, macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation* 1998; 98: 224-33.
20. Nabel E, Pompili V, Plautz G, Nabel G. Gene transfer and vascular disease. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 445-55.
21. Feldman L, Pastore C, Aubailly N, et al. Low-efficiency of percutaneous adenovirus-mediated arterial gene transfer in the atherosclerotic rabbit. *J Clin Invest* 1995; 95: 2662-71.
22. Lafont A, Loirand G, Pacaud P, Vilde F, Lemarchand P, Escande D. Vasomotor dysfunction early after exposure of normal rabbit arteries to an adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1033-40.
23. Yonemitsu Y, Kaneda Y, Morishita R, Nakagawa K, Nakashima Y, Sueishi K. Characterization of *in vivo* gene transfer into the arterial wall mediated by the Sendai virus (hemagglutinating virus of Japan) liposomes: an effective tool for the *in vivo* study of arterial diseases. *Lab Invest* 1996; 75: 313-23.
24. Brieger D, Topol E. Local drug delivery systems and prevention of restenosis. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 405-13.
25. Amant C, Bauters C, Bodard J, et al. D allele of the angiotensin I-converting enzyme is a major risk factor for restenosis after coronary stenting. *Circulation* 1997; 96: 56-60.
26. Chen S, Wilson J, Muller D. Adenovirus-mediated gene transfer of soluble vascular cell adhesion molecule to porcine interposition vein grafts. *Circulation* 1994; 89: 1922-8.
27. Grossman M, Raper S, Kozarsky K. Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nat Genet* 1994; 6: 335-41.
28. Bowles NE, Wang Q, Towbin JA. Prospects for adenovirus-mediated gene therapy of inherited diseases of the myocardium. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 422-30.
29. Leor J, Prentice H, Sartorelli V, et al. Gene transfer and cell transplant: an experimental approach to repair a «broken heart». *Cardiovasc Res* 1997; 35: 431-41.

TIRÉS À PART

S. Adnot.

Summary

Gene therapy in cardiovascular diseases

Gene therapy for cardiovascular disorders is now fast developing with most therapies being devoted to the consequences (ischemia) rather than the causes of atherosclerotic diseases. Recent human clinical trials have shown that injection of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor promotes collateral vessel development in patients with critical limb

ischemia. Promising studies in animals have also fueled enthusiasm for treatment of human restenosis by gene therapy, but clinical applications are warranted. Application of gene transfer to other cardiovascular diseases will require the coordinated development of a variety of new technologies, as well as a better definition of cellular and gene targets.



INSTITUT COCHIN DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE

XVI^e Journée Jean-Claude-Dreyfus de Génétique et de Pathologie Moléculaires

GÈNES, NUTRITION ET MÉTABOLISME **Vendredi 17 septembre 1999**

Grand Amphithéâtre de la Faculté de Médecine Cochin Port-Royal
24, rue du Faubourg-Saint-Jacques – 75014 PARIS, France
(Métro : Saint Jacques ou Port-Royal – Bus : 91 et 83)

Session n° 1 : ADIPOCYTOGÈNESE ET OBÉSITÉ

**Session n° 2 : GÉNÉTIQUE ET PHYSIOPATHOLOGIE
DU DIABÈTE**

Session n° 3 : RÉGULATION NUTRITIONNELLE DES GÈNES

Session n° 4 : MITOCHONDRIE, GÉNÉTIQUE ET MALADIES

Renseignements et demande de bulletin à :

APEMM CONGRÈS (Secrétariat d'Axel KAHN)
Faculté de Médecine Cochin – 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques – 75014 PARIS, FRANCE
Tél.-Fax : 01 44 41 24 41

Inscription : 250 F – avant le 20 août 1999

Paiement par chèque ou bon de commande d'organisme au nom de :
APEMM CONGRÈS (Association loi 1901)