

Les brèves de ce numéro ont été préparées par :

Pascale Borensztein <sup>(1)</sup>  
 Élisabeth Cramer <sup>(1)</sup>  
 Laure Coulombel <sup>(1)</sup>  
 Simone Gilgenkrantz <sup>(2)</sup>  
 Yves Lévy <sup>(3)</sup>  
 Vincent Lotteau <sup>(4)</sup>

**SOMMAIRE DES BRÈVES**

Mutation du gène <i>CD45</i> et déficit immunitaire combiné sévère (DICS) (p. 688).	Plus bleu que le bleu de tes yeux (p. 697).
Interféron $\gamma$ et athérosclérose (p. 691).	Vaccin antitumoral dans le cancer du rein (p. 703).
L'apoptose, un facteur de croissance du trypanosome (p. 691).	Nos ancêtres, de minuscules singes chinois (p. 703).
Lucy grimant aux arbres ou marchant sur les mains ? (p. 692).	Vers un effet surrénalien de la LH ? (p. 707).
Le long périple des anabaptistes et du syndrome d'Ellis-van-Crefeld (p. 696).	De l'utilité du tabac comme véhicule de transgénèse ! (p. 707).
Efficacité des inhibiteurs du TNF dans le traitement de la maladie de Still (p. 696).	Plaidoyer pour un angioblaste médullaire (p. 709).
	Et si nous nous étions trompés sur les mitochondries ? (p. 712).

## Traitement du déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X par transfert ex vivo du gène *gc*

Nous rapportons, chez deux patients, l'observation d'une correction du déficit immunitaire observé dans le syndrome appelé déficit immunitaire combiné sévère (DICS) lié à l'X après transfert *ex vivo* du gène *gc* dans les cellules médullaires CD34<sup>+</sup> [1].

### Le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X

Le DICS lié à l'X est caractérisé par un défaut complet de développement des lymphocytes T et *natural killer* (NK). Il est provoqué par des mutations du gène qui code pour la sous-unité *gc* commune à plusieurs récepteurs de cytokines, mutations qui ont pour conséquence la production d'une protéine non fonctionnelle. Cette protéine *gc*, exprimée par toutes les cellules d'origine hématopoïétique, est un composant de la structure des récepteurs de 5 interleukines (IL) : IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et IL-15 (*m/s* 1994, n° 2, p. 233). Ces cytokines, en se liant à leur récepteur,

induisent de puissants signaux de survie et de prolifération cellulaire. Dans le DICS, le défaut d'interaction de l'IL-7 avec son récepteur muté exprimé à la surface des précurseurs lymphoïdes indifférenciés est responsable du blocage de différenciation des lymphocytes T. De même, l'absence de réponse à l'IL-15, cytokine essentielle lors du développement NK [2], explique le défaut de développement de cette lignée [2]. Le DICS lié à l'X est une maladie létale dans les premières années de vie en l'absence de traitement en raison de la survenue d'infections multiples et graves. Le traitement conventionnel consiste en l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les résultats sont excellents pour les patients disposant d'un donneur familial HLA-identique, alors que, en l'absence d'un tel donneur, l'espoir de survie est de l'ordre de 60 % à 70 % seulement avec un risque élevé de déficit persistant de la production des anticorps [3, 4] (*m/s* 1999, n° 8-9, p. 1027-8).

(1) Inserm U. 474, Maternité Port-Royal, 123, boulevard de Port-Royal, 75014 Paris, France.  
 (2) 9, rue Basse, 54330 Clérey-sur-Brenon, France.  
 (3) Unité d'immunologie clinique, CHU Henri-Mondor, 51, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 94010 Créteil Cedex, France.  
 (4) Inserm U. 503, Immunobiologie moléculaire, École normale supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.

## Thérapie génique des DICS

Plusieurs raisons contribuent à faire du DICS lié à l'X une maladie modèle pour un traitement par transfert de gène.

La maladie est grave, son traitement insuffisant, le gène responsable est identifié, son expression est ubiquitaire dans le système hématopoïétique et constante, minimisant les risques d'une surexpression non ciblée de la protéine. L'expression membranaire, et donc la fonction, sont contrôlées par son association à d'autres sous-unités de récepteurs. En outre, la fonction de la protéine  $\gamma$ c devrait conférer aux cellules qui l'expriment un potentiel de croissance *in vivo* important susceptible de donner naissance à un grand nombre de lymphocytes à longue durée de vie. L'observation chez un patient d'une correction partielle et durable du phénotype de la maladie liée à une réversion de la mutation du gène  $\gamma$ c dans un précurseur de lymphocytes T, conforte grandement cette hypothèse [5, 6] (*m/s* 1996, n° 10, p. 1167).

Cependant à ce jour, la thérapie génique des déficits immunitaires a donné des résultats cliniques décevants. L'essentiel des travaux ont concerné une autre forme de DICS: le déficit en adénosine désaminase (ADA) caractérisé par un défaut global de développement des lymphocytes. Les tentatives de transfert du gène ADA dans les précurseurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> à l'aide de vecteurs rétroviraux murins dérivés du virus Moloney n'ont permis d'obtenir qu'un très faible développement de lymphocytes transduits. Ce résultat a été observé quelle que soit l'origine des cellules CD34<sup>+</sup>, médullaires ou du sang de cordon [7-9]. Il était pourtant escompté, pour ce DICS comme pour le déficit en  $\gamma$ c, qu'un avantage sélectif serait conféré aux cellules transduites. Trois facteurs expliquent qu'il n'en ait pas été ainsi:

- Tous les malades ont été simultanément substitués en ADA par injection intramusculaire de l'enzyme, traitement susceptible de faire perdre aux cellules transduites tout avantage de croissance;

- Le déficit en ADA affecte aussi la fonction des cellules épithéliales du thymus, défaut qui n'est pas corrigé par un transfert du gène dans les cellules hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>;

- Les protocoles de transfert de gène utilisés en 1993 (date de ces essais cliniques) n'étaient, au regard de la situation actuelle, pas optimaux.

En dépit de la difficulté de transduire les CSH chez l'homme que suggéraient ces essais, dans le cas des DICS liés à l'X, l'absence de traitement substitutif disponible, le caractère strictement intrinsèque des conséquences lymphocytaires du déficit en  $\gamma$ c (absence d'atteinte de l'environnement thymique), et les progrès des méthodes de transfert de gènes dans les cellules CD34<sup>+</sup> humaines ont été autant de facteurs favorables à une approche de thérapie génique dans ce déficit immunitaire.

### Protocole et résultats

Cinq patients ont été inclus dans ce protocole [10-13]. Il prévoit l'isolement de cellules CD34<sup>+</sup> d'origine médullaire, leur préactivation par des cytokines, *stem cell factor* (SCF), *megakaryocyte - growth and differentiation factor* (MGDF), ligand de FLT3 (FLT3-L) et IL-3 pendant 24 heures, puis leur infection. L'infection est réalisée en incubant les cellules (une fois par jour trois jours de suite) en présence de surnageant contenant le vecteur rétroviral MFG- $\gamma$ c. Ce vecteur contient l'ADNc de  $\gamma$ c placé sous le contrôle transcriptionnel du LTR (*long terminal repeat*) viral. Ce virus est incapable de réplication. Les 3 cycles d'infection se font en poches closes recouvertes d'un fragment de fibronectine dont l'utilisation augmente significativement la proportion des cellules infectées [14]. Dans ces conditions, environ 30 % à 40 % des cellules CD34<sup>+</sup> réinjectées aux patients avaient été transduites [15]. Les résultats sont aujourd'hui analysables avec un recul suffisant pour les 2 premiers patients traités il y a 10 et 11 mois [1]. Aucun effet secondaire n'a été observé. Après un délai d'environ 3 mois suivant la réinjection, se sont développés un nombre normal de lymphocytes T sanguins,

et des lymphocytes NK, qui, tous, expriment  $\gamma$ c. Le niveau d'expression membranaire est comparable au niveau physiologique. Cette situation est stable avec un recul de 10 et 11 mois. Les lymphocytes T ont un répertoire diversifié et répondent à des stimulations antigéniques. La fraction de lymphocytes B transduits est beaucoup plus faible. Cependant, une réponse anticorps normale après vaccination a été observée sans que l'on puisse dire aujourd'hui si cette réponse est le fruit de cellules B transduites ou pas. Un faible contingent de cellules myéloïdes transduites est également détectable plusieurs mois après le traitement. Ce résultat permet à ces enfants de vivre en bonne santé, sans traitement, au sein de leur famille après les 3 premiers mois d'hospitalisation.

Ces résultats, bien qu'encore préliminaires compte tenu du petit nombre de malades traités et de la durée d'évolution, sont indiscutablement positifs. Ils confirment que l'hypothèse initiale était juste et démontrent que l'expression de  $\gamma$ c confère une faculté de développement considérable aux précurseurs lymphoïdes. Enfin, d'une certaine façon, ils constituent une preuve du principe d'efficacité d'une thérapie génique.

### À long terme ?

Les résultats obtenus soulèvent bien des questions: la question essentielle concerne l'évolution à long terme. Cruciale pour les patients traités, elle l'est aussi pour les perspectives de développement de la thérapie génique *ex vivo* des cellules hématopoïétiques selon cette méthodologie. Une extinction de l'expression du transgène est théoriquement envisageable, comme cela a déjà été observé pour des transgènes placés sous le contrôle du LTR viral [16]. Cependant, la pression de sélection induite par l'expression de  $\gamma$ c rend cette hypothèse peu probable.

Quelle est la nature de la cellule transduite la plus immature (*figure 1*)? Une hypothèse prudente est de considérer que seuls des progéniteurs différenciés lymphoïdes et myéloïdes (cellules souches lymphoïdes et myéloïdes) ont été infectés

(figure 1, flèche 3). Dans ce cas, dans la mesure où les cellules souches lymphoïdes et myéloïdes n'ont pas de capacité d'autorenouvellement, l'effet obtenu en périphérie devrait être transitoire pour les cellules myéloïdes, et une seule vague de lymphocytes transduits se serait développée. Quelques arguments laissent penser qu'il n'en est pas ainsi. En effet, les 2 patients traités ont, 9 mois après le traitement, un thymus détectable et une grande majorité des lymphocytes T circulants ont un phénotype naïf. Ces données suggèrent fortement qu'une thymopoïèse se poursuit et qu'il existe donc (encore) des progéniteurs immatures transduits. Il se pourrait donc qu'une cellule plus immature, encore pluripotente, ait été infectée (figure 1, flèche 2, voir [1]). Cette hypothèse rendrait compte de la détection persistante, bien qu'en faible proportion, de cellules myéloïdes transduites en périphérie. L'étude des sites d'intégration (multiples dans les lymphocytes T) devrait permettre de trancher cette question, et de prédire... l'évolution à long terme. Le fait qu'il soit aujourd'hui possible d'obtenir *in vitro* la prolifération sans différenciation de précurseurs immatures CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> en présence des cytokines SCF, MGDF et flt-3L (employées dans cet essai) est compatible avec cette hypothèse puisque de telles cellules pourraient ainsi avoir été la cible d'une infection efficace par le rétrovirus utilisé.

### Perspectives

Les résultats obtenus devront tout d'abord être confirmés par le traitement d'un plus grand nombre de malades. Cependant, on peut dès aujourd'hui envisager le traitement d'autres pathologies selon le même protocole (Tableau I): les DICS de physiopathologie proche, et dont les conséquences sont rigoureusement identiques comme le déficit en kinase JAK-3, protéine associée à  $\gamma_c$  (*m/s* 1996, n° 2, p. 265). On sait d'ailleurs que, chez la souris *JAK-3<sup>-/-</sup>*, des cellules transduites greffées disposant d'un avantage sélectif permettent la correction du déficit immunitaire [17] (*m/s* 1998, n° 4, p. 510).

*m/s* n° 5, vol. 16, mai 2000

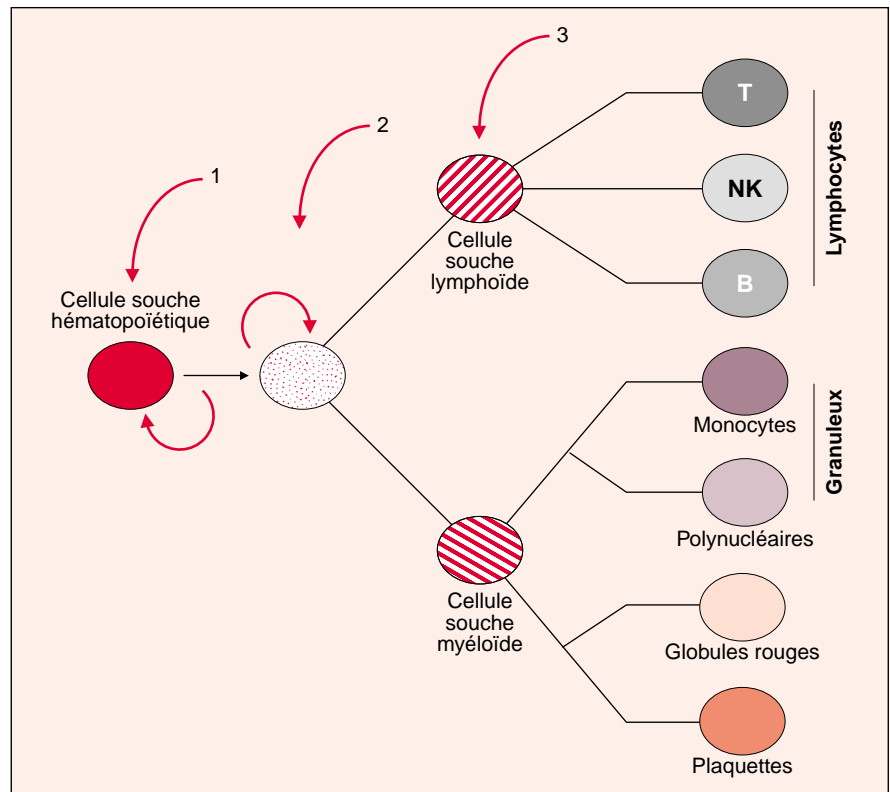


Figure 1. **Représentation schématique de la différenciation hématopoïétique et des progéniteurs cibles de la correction par transfert de gènes dans le DICS lié à l'X.**  $\curvearrowright$  signifie que la cellule est en cycle;  $\curvearrowleft$  dénote la capacité d'autorenouvellement. Les 3 flèches numérotées indiquent la cellule potentielle cible du transfert de gènes: (1) cellule souche hématopoïétique pluripotente et dotée d'autorenouvellement; (2) cellule souche pluripotente ayant perdu sa capacité d'autorenouvellement; (3) cellule souche lymphoïde.

Autre candidat, le déficit en chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-7 qui devrait pouvoir être corrigé. Les DICS par anomalies de recombinaison des éléments V(D)J des gènes des récepteurs T pour l'antigène et des immunoglobulines (déficits en Rag-1 et Rag-2) (*m/s* 1997, n° 1, p. 115) sont les suivants sur la liste, bien que l'avantage sélectif des cellules transduites soit probablement moins fort. Peut-on envisager de traiter le déficit en ADA sans substitution concomitante? Enfin, le déficit en kinase ZAP-70 (*m/s* 1995, n° 2, p. 268-72) et le syndrome de Wiskott-Aldrich (*m/s* 1996, n° 10, p. 1173; 1998, n° 11, p. 1280) sont également susceptibles de bénéficier

de cette approche, bien que dans ces pathologies se posent des problèmes liés à une expression aberrante ou à une surexpression du gène thérapeutique introduit (Tableau I).

Les progrès à venir dans les domaines de la vectorologie et du ciblage (vecteurs délétés de séquence *silencer*, utilisation de lentivirus) [18, 19], utilisation de protéines d'enveloppe mieux adaptées aux cellules humaines (comme l'enveloppe du *gibbon ape leukemia virus*) permettent, dans ce nouveau contexte, d'envisager le transfert de gènes dans les précurseurs hématopoïétiques sous un angle plus favorable.

Tableau I

APPLICATIONS POTENTIELLES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE *EX VIVO* AUX DÉFICITS IMMUNITAIRES

Maladies	Probabilités de succès	Risque
<b>1. DICS</b>		
JAK-3	+++	surexpression de JAK-3 ? expression myéloïde aberrante toxicité de l'expression constitutive de Rag-1 ou Rag-2
IL7R $\alpha$	+++	
Rag-1/-2	++	
ADA	?	surexpression de ZAP-70 ? expression aberrante myéloïde, B
ZAP-70	+	
<b>2. Syndrome de Wiskott Aldrich</b>	+	surexpression de WASP

1. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G, *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288: 669-72.

2. Sugamura K, Asao H, Kondo M, *et al.* The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in X- SCID. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 179-205.

3. Buckley RH, Schiff RI, Markert L, *et al.* Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 1999; 340: 508-16.

4bis. Fischer A. Thirty years of bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 1999; 340: 559-61.

4. Stephan V, Wahn V, Le Deist F, *et al.* Atypical X-linked severe combined immunodeficiency due to possible spontaneous reversion of the genetic defect in T cells. *N Engl Med* 1996; 335: 1563-7.

5. Bouso P, Wahn V, Douagi G, *et al.* Diversity, functionality, and stability of the T cell repertoire derived *in vivo* from a single human T cell precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 274-8.

6. Kohn DB, Weinberg KI, Nolta JA, *et al.* Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with ADA deficiency. *Nat Med* 1995; 1: 1017-23.

7. Kohn DB, Hershfield MS, Carbonaro D, *et al.* T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34(+) cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 1998; 4: 775-80.

8. Bordignon C, Notarengelo LD, Nobili N, *et al.* Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bon marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 1995; 270: 470-5.

9. Hoogerbrugge PM, Van Beusechem VW, Fischer A, *et al.* Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency. *Gene Ther* 1996; 3: 179-85.

10. Hacein-Bey S, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, *et al.*  $\gamma$ c gene transfer into SCID X1 patients B-cell lines restores high affinity IL-2 receptor expression and function. *Blood* 1996; 87: 108-16.

11. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G, *et al.* Role of IL-2, IL7 and IL-15 in natural killer cell differentiation from cord blood hematopoietic progenitor cells and from  $\gamma$ c transduced SCID-X1 bone marrow. *Blood* 1996; 88: 3901-9.

12. Hacein-Bey S, De Saint Basile G, Lemerle JP, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. SC, FLT-3l, IL-7, IL-1a and IL-15 cytokines restores T-cell differentiation from  $\gamma$ c(-) SCID-X1 hematopoietic progenitor cells in murine fetal thymic organ cultures. *Blood* 1999; 92: 4090-7.

13. Soudais C, Tsuzino S, Sharara L, Guy-Grand, Taniguchi T, Fischer A, Di Santo JP. Stable and functional lymphoid reconstitution of common cytokine receptor gamma chain deficient mice by retroviral-mediated gene transfer. *Blood* 2000 (sous presse).

14. Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams DA. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 1996; 2: 876-82.

15. Fischer A, de Saint Basile G, Hacein-Bey S, Soudais C, Disanto J, Cavazzana-Calvo M. Thérapie génique des déficits immunitaires: approche expérimentale et premiers résultats cliniques. *Med Sci* 1999; 15: 606-14.

16. Robbins PB, Skelton DC, Yu XJ, Halene S, Leonard EH, Kohn DB. Consistent, persistent expression from modified retroviral vectors in murine hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10182-7.

17. Bunting KD, Sangster MY, Ihle JN, Sorrentino BP. Restoration of lymphocyte function in JAK-3 deficient mice by retroviral-mediated gene transfer. *Nat Med* 1998; 4: 58-64.

18. Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 1999; 283: 682-6.

**Alain Fischer**  
**Salima Hacein-Bey**  
**Françoise Le Deist**  
**Marina Cavazzana-Calvo**

*Unité d'immunologie et d'hématologie pédiatriques et Inserm U. 429, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France.*