

## L'adénovirus : vecteur de thérapie génique ?

Ne pas accepter la fatalité de maladies qui seraient au-delà de toute perspective thérapeutique, telle est, pour les médecins, une ardente obligation. Les maladies génétiques prises dans leur ensemble représentent probablement l'une des pathologies essentielles de l'espèce humaine ; c'est dire l'importance de toute perspective thérapeutique les concernant. Il n'y a probablement ni indication ni sagesse à intervenir sur l'œuf et le germe. En revanche, traiter des malades souffrant d'une affection génétique en apportant aux cellules anormales un fragment d'ADN leur faisant défaut, ne pose guère que les problèmes — d'ailleurs considérables — de la faisabilité et de l'innocuité. L'adénovirus, responsable d'affections humaines fréquentes et généralement bénignes, pourrait être un vecteur idéal pour véhiculer de tels fragments d'ADN vers les cellules atteintes. Cet article rapporte un premier succès de cette stratégie dans un modèle animal d'une maladie humaine du cycle hépatique de l'urée.

Jean-François Chasse  
Massimo Levrero  
Pierre Kamoun  
Michèle Minet  
Pascale Briand  
Michel Perricaudet

### ADRESSES

J.-F. Chasse : *assistant des hôpitaux, assistant hospitalier*. P. Briand : *chargée de recherche à l'Inserm*. P. Kamoun : *professeur de biochimie, université Paris V*. Laboratoire de biochimie génétique, hôpital Necker, Enfants malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

M. Perricaudet : *directeur de recherche au Cnrs*. Institut Gustave-Roussy, laboratoire de génétique des virus oncogènes, PR11, 9, rue Camille-Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France.

M. Levrero : *professeur associé*. Prima clinica medica, policlinico Umberto Primo, 00162, Rome, Italie.

*m/s* n° 5 vol. 5, mai 89

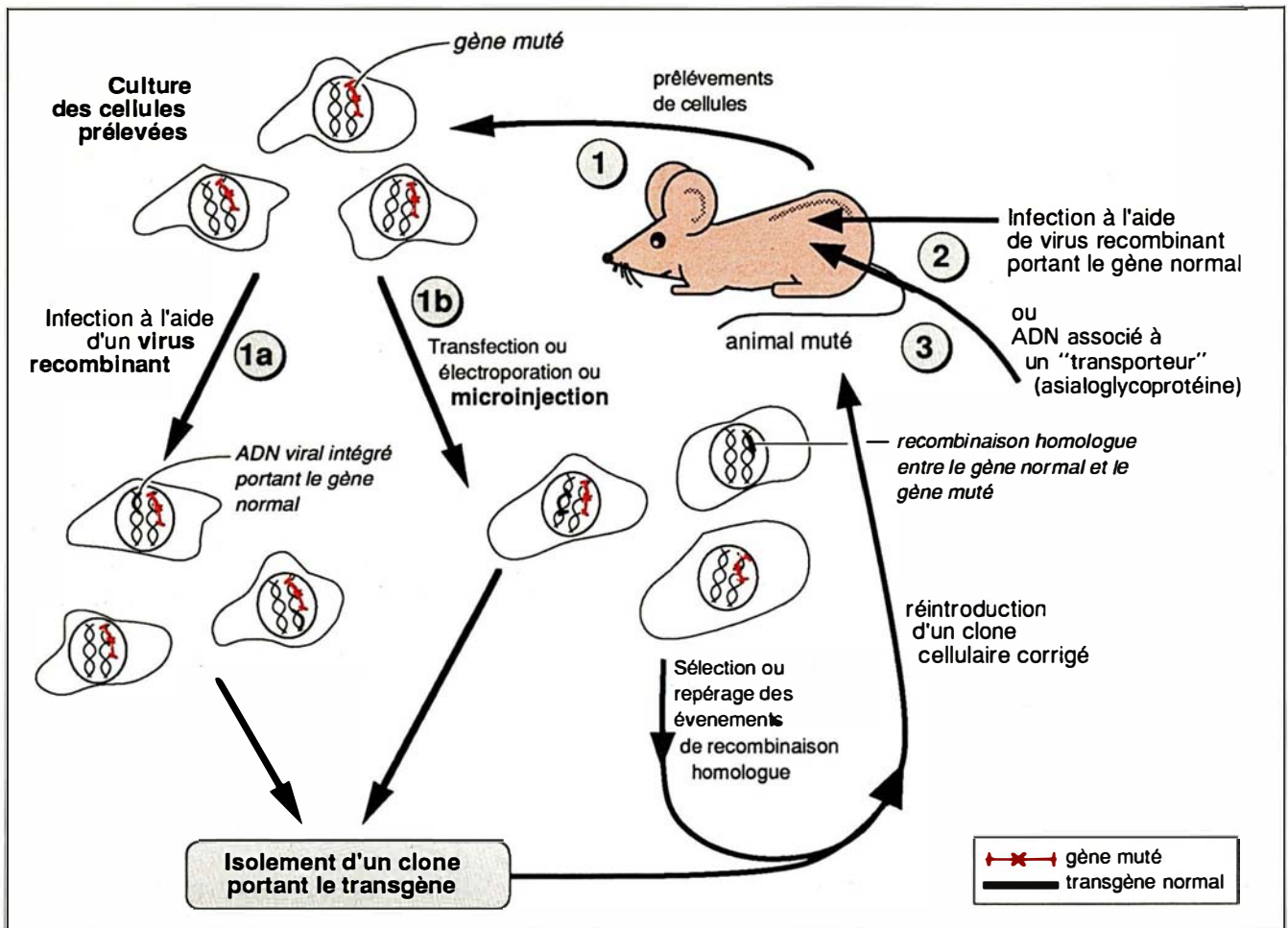
**C**hez l'homme il n'est de thérapie génique concevable que de somatique, une thérapie génique germinale étant éthiquement inacceptable et conceptuellement sans fondement. Elle nécessiterait en effet que soient triés les embryons sains et les embryons mutés afin que, sur ces derniers seulement, soient tentée une greffe de gène. Mais alors c'est à l'évidence la réimplantation des embryons dont on aurait pu prouver le caractère normal qui s'imposerait. Ce tri des embryons appartenait, encore très récemment, au domaine de la science-fiction. Les techniques d'amplification d'ADN (PCR\*), qui permettent de détecter la présence d'une séquence d'ADN particulière dans une seule cellule rendent ce tri concevable [1-3].

### Les techniques de thérapies géniques somatiques

Les techniques de thérapie génique somatique (*figure 1*) sont, contrairement à celles de thérapie génique germinale, tout à fait envisageables

chez l'homme, à condition que soient résolus un certain nombre de problèmes parmi lesquels celui de l'évaluation correct des risques encourus par rapport aux avantages escomptés. La qualité des résultats, liée à l'expression du gène introduit, est fonction du niveau de cette expression, de la similitude entre les régulations qui s'exercent sur elle et celles qui gouvernent le gène endogène à l'état normal, et enfin de la possibilité de cibler l'expression ou le produit de l'expression du gène là où il doit venir pallier l'anomalie à traiter. Les risques découlent quant à eux des modifications délétères induites par l'introduction du gène dans le génome des cellules. Il se pourrait, par exemple, que l'intégration du transgène se fit dans un anti-oncogène, inhibant son activité, et rendant la cellule particulièrement susceptible à la cancérisation, ou au

\* PCR, *polymerase chain reaction*, voir *m/s* n° 8, vol. 4, p. 515-517.



**Figure 1. Les techniques de thérapie génique somatique. (1).** Des cellules (fibroblastes, cellules souches de la moelle osseuse, etc.) sont prélevées sur l'organisme muté et mises en culture. La séquence d'ADN codant pour la protéine normale, absente chez l'animal déficitaire, est introduite dans ces cellules. Le mode d'introduction du transgène peut être l'infection à l'aide de rétrovirus ou autres virus recombinants (1a), la transfection, l'électroporation ou encore la microinjection (1b). L'utilisation d'un virus (1a) conduit à une intégration au hasard du transgène. La thérapie est alors effectuée par addition au génome muté, d'une copie du gène normal. Cette technique ne permet donc pas de traiter une anomalie dominante liée à l'action dominante du produit du gène muté, et peut théoriquement provoquer, par mutagenèse insertionnelle, l'apparition de clones cellulaires ayant un pouvoir cancérigène. L'utilisation des techniques de transfection, électroporation ou microinjection permet d'introduire des séquences dépourvues de séquences virales et de se placer dans des conditions favorisant une recombinaison homologue entre le gène muté et le gène normal introduit. Les clones cellulaires dans lesquels le remplacement du gène muté par le gène normal s'est effectué peuvent être sélectionnés ou simplement repérés. Ceux-là seulement, seront réintroduits dans l'animal. Cette technique offre l'avantage d'éliminer les risques de mutagenèse insertionnelle et d'être applicable à une mutation aboutissant à la synthèse d'un produit délétère puisqu'il peut y avoir vraiment, remplacement d'une séquence mutée par une séquence normale. (2). L'infection directe de l'organisme à l'aide d'un virus recombinant permet d'effectuer une thérapie génique dans des types cellulaires que l'on ne peut isoler et maintenir en culture. Elle permet aussi d'effectuer des thérapies très précocement après la naissance voire même in utero. Les risques majeurs sont la possibilité d'infection de la lignée germinale et le développement de clones cancéreux par mutagenèse insertionnelle. (3). L'introduction directe dans l'organisme, d'ADN lié à un « transporteur » a aussi été tentée conduisant à des niveaux très faibles et à un caractère transitoire de l'expression des gènes introduits. Un ciblage lié au mode d'introduction ou à des récepteurs portés par le « transporteur » pourrait permettre une correction spécifique dans un organe ou un type cellulaire.

contraire qu'elle provoquât une activation d'un oncogène adjacent au site d'intégration, entraînant là encore une transformation de la cellule. De tels risques seraient éliminés

si l'intégration se faisait par recombinaison homologue, c'est-à-dire si l'on parvenait à intégrer le gène normal à la place du gène muté. Les conditions qui favorisent la recombinaison

homologue [4-6] et les techniques qui permettent de trier les cellules dans lesquelles de tels événements se sont produits (sélection ou plus généralement identification

des clones portant une recombinaison homologue par amplification enzymatique) sont aujourd'hui disponibles [7-11]. Elles sont cependant applicables aux thérapies de cellules aisément manipulables *ex vivo* et qui peuvent être réintroduites ultérieurement dans l'organisme (fibroblastes [12, 13], cellules de la moelle osseuse [14, 15], hépatocytes en culture primaire [16, 17], kératinocytes [18]). Pour ces types cellulaires, la meilleure technique pour introduire l'ADN exogène est probablement la micro-injection qui conduit à de hauts rendements d'intégration et permet de transférer des fragments de grande taille dépourvus de séquences plasmidiques ou virales. Un repérage des cellules ayant subi une recombinaison homologue et la réintroduction de celles-ci dans l'organisme, constituent les étapes de ce que l'on peut considérer comme étant à l'heure actuelle, le schéma optimal d'une thérapie génique. A ce jour cependant, la technique la plus utilisée pour transférer un gène dans des cellules de mammifères en culture est l'infection à l'aide de rétrovirus recombinants portant le gène à introduire [14, 16, 17, 19-23]. Dans ce cas, l'intégration se fait au hasard, n'écartant pas les risques de mutagenèse insertionnelle [24, 25], qui sont d'autant plus à redouter que le rétrovirus recombinant conserve ses *enhancer*\*, séquences susceptibles d'activer des gènes situés à une grande distance. D'autres vecteurs viraux sont aussi utilisés, tels des papovavirus, des virus herpétiques ou encore des poxvirus [26]. Ces systèmes présentent l'avantage, par rapport aux autres procédés de transfert de gènes dans les cellules de mammifères en culture — qu'il s'agisse de la fusion cellulaire, de l'électroporation, de l'utilisation de techniques physico-chimiques à base de DÉAE dextran ou de phosphate de calcium — de transférer très efficacement

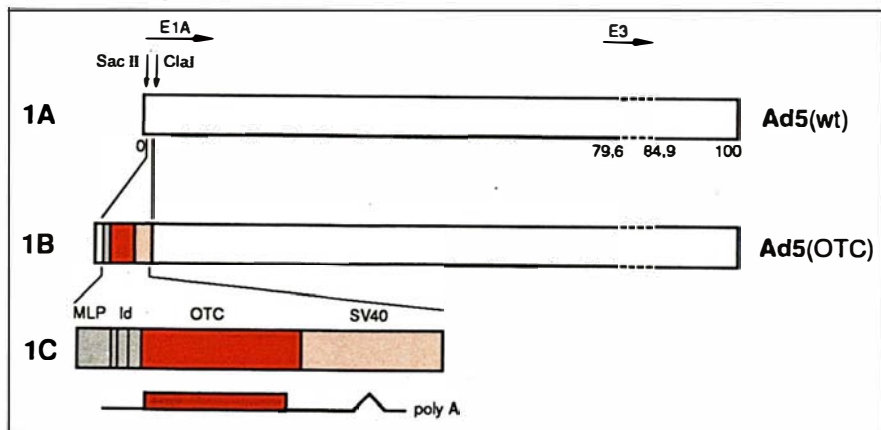


Figure 2. **1A :** structure du génome de l'adénovirus 5 utilisé comme vecteur (Ad5 wt-wild type : type sauvage). La région E3 (79,6-84,9 unités de carte), qui n'est pas essentielle à la multiplication du virus, est déléetée. **1B :** structure de l'Ad5 recombinant Ad5 (OTC). La séquence OTC sous contrôle du promoteur viral MLP (major late promoter : promoteur majeur tardif) a été insérée entre les sites de restrictions SacII et ClaI de la région E1A d'Ad5 wt (1a). **1C :** structure détaillée de l'ADNc de l'OTC cloné dans l'adénovirus et de son message. L'ADNc de l'OTC suivi de séquences d'épissage et de polyadénylation de SV40 a été cloné sous contrôle du promoteur majeur tardif MLP et de séquences régulatrices Id.

l'ADN exogène dans les cellules. L'introduction directe, dans l'organisme, du gène normal est rendue obligatoire lorsque le déficit à pallier nécessite que le gène soit présent dans des cellules que l'on ne peut pas manipuler *ex vivo*, ou encore lorsque la thérapie, pour être efficace, nécessite une intervention très précoce après la naissance, voire même *in utero*. Diverses techniques basées sur l'utilisation de « transporteurs » d'ADN ont été utilisées dans ce but. Leur efficacité reste faible et la correction obtenue de courte durée [27, 28]. C'est pourquoi l'obtention de systèmes de transfert viraux, performant et présentant le minimum de risques, est très important. Les adénovirus ont, dans cette optique, plusieurs propriétés qui les rendent particulièrement attrayants pour le transfert de gènes chez l'animal et peut-être aussi chez l'homme.

### L'adénovirus, vecteur de clonage et d'expression

Les adénovirus se répliquent dans les noyaux des cellules infectées et peuvent transduire des segments d'ADN

de plusieurs milliers de paires de bases. La majorité des sérotypes d'adénovirus humains n'entraînent que des signes cliniques extrêmement bénins et ont un large spectre d'hôte. Les sérotypes Ad2 et Ad5 sont bien caractérisés génétiquement et biochimiquement, ce qui rend aisée leur manipulation. Le génome de l'adénovirus est une molécule d'ADN bicaténaire comportant 36 000 paires de bases et possédant une répétition inversée de 100 nucléotides aux extrémités (ITR : *inverted terminal repeat*). Le cycle infectieux dure environ 30 heures et est divisé en deux phases, précoce et tardive, qui sont séparées par le début de la réplication de l'ADN viral. Le gène *E1A*, localisé à l'extrémité gauche du génome viral (figure 2) code pour des protéines régulatrices de la transcription des autres gènes de l'adénovirus. L'expression de la région E1A, dans certaines cellules, conjointement à celle de la région E1B adjacente, peut, par ailleurs, induire un processus de « transformation cellulaire ». C'est ainsi qu'une lignée de cellules humaines, d'origine embryonnaire, a pu être établie par Harrison en 1977.

\* *Enhancer* : motifs d'ADN reconnus par des protéines et intervenant dans la régulation de l'expression des gènes. Ces séquences stimulatrices sont actives à distance d'un gène et indépendamment de leur orientation sur le brin d'ADN (voir Lexique m/s, structure et fonctions du génome, suppl. au n° 7, vol. 2, p. 15).

## RÉFÉRENCES

- Li H, Gyllensten UB, Cui X, *et al.* Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 1988; 335: 414-7.
- King D, Wall RJ. Identification of specific gene sequences in preimplantation embryos by genomic amplification: detection of a transgene. *Mol Rep Dev* 1988; 1: 57-62.
- Bacchus C, Buselmaier W. Blastomere karyotyping and transfer of chromosomally selected embryos implications for the production of specific animal models and human prenatal diagnosis. *Hum Genet* 1988; 80: 333-6.
- Singer BS. On the role of homologous sequences in chromosomal rearrangements. *Gen Dev* 1988; 2: 1800-11.
- Thomas KR, Folger KR, Capecchi R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 1986; 44: 419-28.
- Chang XB, Wilson JH. Modification of DNA ends can decrease end joining relative to homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4959-63.
- Nandi AK, Roginski RS, Gregg RG, Smithies O, Skoultschi AI. Regulated expression of genes inserted at the human chromosomal  $\beta$ -globin locus by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3845-9.
- Jasin M, Berg P. Homologous integration in mammalian cells without target gene selection. *Gen Dev* 1988; 2: 1353-63.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into human chromosomal  $\beta$ -globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985; 317: 230-4.
- Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51: 503-12.
- Kim HS, Smithies O. Recombinant fragment assay for gene targeting based on polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 8887-8903.
- Selden R, Skoskiewicz MJ, Howie KB, Russell PS, Good HM. Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implications for gene therapy. *Science* 1987; 236: 714-8.
- Garver RI, Chytil A, Courtney M, Crystal RG. Clonal gene therapy: transplanted mouse fibroblast clones express human alpha 1 antitrypsin gene *in vivo*. *Science* 1987; 237: 761-4.
- Dzierzak FA, Papayannopoulou T, Mulligan RC. Lineage specific expression of a human  $\beta$ -globine gene in murine bone marrow transplant recipients reconstituted with retrovirus-transduced stem cells. *Nature* 1988; 331: 35-41.
- Hoogerbrugge PM, Suzuki K, Suzuki K, *et al.* Donor-derived cells in the central nervous system of twitcher mice after bone marrow transplantation. *Science* 1988; 239: 1035-8.
- Wilson JM, Jefferson DM, Chowdhury JR, Novikoff PM, Johnston DE, Mulligan RC. Retrovirus mediated transduction of adult hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3014-8.
- Ledley F, Darlington GJ, Hahn T, Woo SLC. Retroviral gene transfer into primary hepatocytes: implications for gene therapy of liver specific functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5335-9.

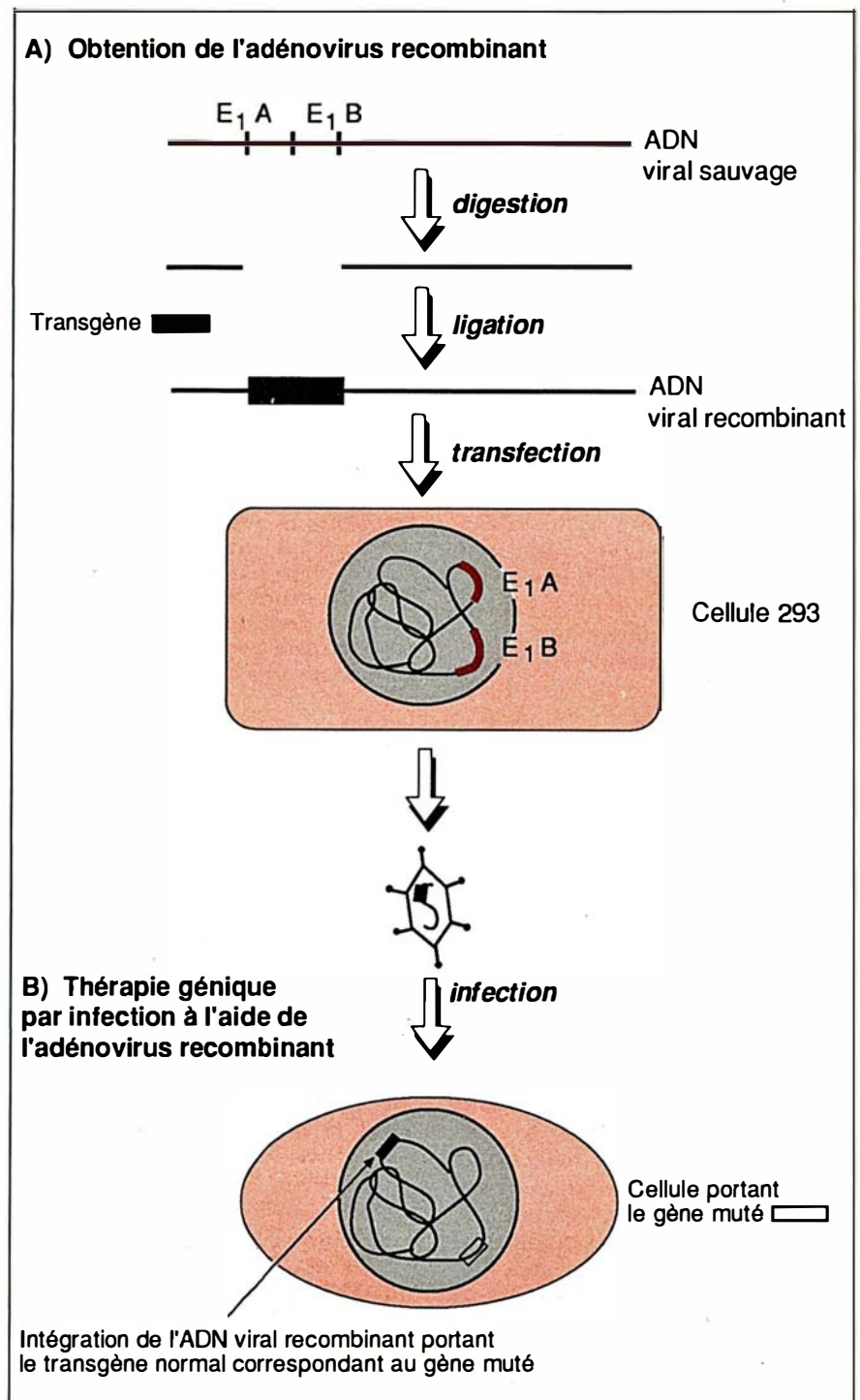


Figure 3. **Production d'un adénovirus recombinant et thérapie génique somatique.** (A). L'obtention de l'adénovirus recombinant est effectuée dans les cellules 293 qui sont d'origine humaine et contiennent les gènes E1A et E1B d'adénovirus intégrés dans leurs chromosomes. Un virus déficient pour E1A et/ou E1B peut ainsi être produit, les protéines E1A et E1B étant synthétisées par la cellule hôte. (B). Le cycle infectieux de l'adénovirus peut être productif ou abortif selon que l'on a ou non réplication de l'ADN viral. La réplication de l'ADN viral fait défaut lorsqu'un gène essentiel du virus est non fonctionnel ou lorsque la cellule infectée est non permissive; l'infection à l'aide d'un virus recombinant déficient peut ainsi conduire à l'intégration de tout ou partie de la séquence recombinante et en particulier du transgène.

Les cellules de cette lignée, appelée 293, contiennent l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus (région E1A et E1B) intégrée dans leurs chromosomes et sont, de ce fait, permises pour la propagation d'adénovirus mutés dans la région E1A et/ou E1B. La construction d'adénovirus transducteurs\* peut donc être réalisée en substituant tout ou partie de la région E1A et/ou E1B, la propagation des virus recombinants défectifs étant effectuée par infection de cellules 293 (figure 3-A). Une fois produit en grande quantité, le virus recombinant peut infecter des cellules dans lesquelles il ne peut se répliquer (figure 3-B). Ce type d'infection peut conduire à l'intégration stable du génome viral dans les chromosomes cellulaires et à l'acquisition par les cellules hôtes des gènes étrangers que véhicule le virus. Le phénotype des cellules infectées, peut ainsi être modifié aisément et de façon stable [29, 31]. L'acquisition de nouveaux gènes par les cellules somatiques d'un animal, devrait donc pouvoir être réalisée à l'aide de ce virus et donner des résultats proches de ceux observés pour des cellules en culture. C'est ainsi par exemple que des anticorps anti-HBs ont pu être obtenus chez des lapins [32] et des hamsters [33] infectés à l'aide d'un adénovirus recombinant portant le gène codant pour la protéine HBs du virus de l'hépatite B.

### **Adénovirus et rétrovirus : les avantages respectifs**

Les adénovirus recombinants peuvent se multiplier sans réarrangements ou perte de matériel génétique. Cette absence de réarrangements les différencie notamment des rétrovirus qui font l'objet de nombreuses modifications au cours de la répllication. Les adénovirus n'activent pas de gènes cellulaires par insertion de leur génome dans le chromosome cellulaire ; ceci les différencie encore des rétrovirus qui portent des promoteurs forts dans leurs longues répétitions terminales (LTR : *long terminal repeat*), capa-

bles d'induire par exemple une transformation néoplasique par activation d'un oncogène auprès duquel ils se seraient intégrés. Ces promoteurs forts peuvent en outre interférer avec ceux des gènes introduits au sein du virus et il est encore peu d'exemples d'expressions normalement contrôlées obtenues après infection à l'aide de rétrovirus recombinants.

Les rétrovirus ont, en revanche, une efficacité d'intégration nettement plus élevée que celle des adénovirus.

### **L'adénovirus : vecteur de thérapie génique ?**

Nous avons choisi de tester la capacité d'adénovirus recombinants à servir de vecteur de thérapie génique chez l'animal, sur un modèle de déficit enzymatique murin que nous avons précédemment utilisé pour réaliser une thérapie génique germinale [34, 35]. Il s'agit d'une lignée de souris déficientes en ornithine transcarbamylase (OTC). L'OTC est une enzyme mitochondriale qui joue un rôle essentiel dans la détoxification de l'ammoniaque des organismes uréotéliques, *via* le cycle de Krebs dont il constitue la deuxième étape [36]. Ses mutations entraînent chez l'homme une symptomatologie plus ou moins sévère suivant l'importance du déficit, le déficit total entraînant la mort des nourrissons dans les premiers jours de vie [37, 38]. Chez l'animal, deux mutations cinétiquement distinctes ont été décrites avec dans les deux cas une modification phénotypique aisément décelable entre la première semaine de vie et le sevrage. Il s'agit d'une absence complète de pelage et d'une hypotrophie jusqu'au sevrage [39]. La souche mutante *spf-ash* que nous avons utilisée a une réduction de l'OTC à 5 % de la normale entraînant une hyperammoniémie accompagnée d'une acidurie orotique prononcée. La création de souris transgéniques portant le gène OTC sous contrôle du promoteur précoce du gène T de SV40 a permis de montrer par ailleurs que le phénotype associé au déficit en OTC peut être corrigé [34, 35]. Pour tenter d'obtenir une même correction phénotypique par infection post-natale à l'aide d'un adénovirus recombinant, nous avons

construit un adénovirus qui porte le gène de l'OTC sous contrôle d'un promoteur viral puissant : le promoteur majeur tardif (MLP) (figure 2).

### **Thérapie génique d'un déficit enzymatique animal à l'aide d'un vecteur adénoviral**

**Construction de l'adénovirus recombinant.** L'ADNc de l'OTC de rat est placé sous le contrôle du promoteur majeur tardif de l'adénovirus et des trois séquences régulatrices L1, L2, L3 (figure 2). L'infection des cellules 293 à l'aide de ce virus permet d'obtenir une activité OTC de 35 micromoles de citrulline formée par heure et par milligramme de protéines ( $\mu\text{mol/h/mg}$ ), cette activité étant nulle dans les cellules témoins. Ceci démontre qu'une synthèse et une maturation correcte de cette enzyme mitochondriale ont été obtenues dans ce type cellulaire.

**Infection de souris déficientes en OTC, par l'adénovirus recombinant.** Injecté à travers la paroi péritonéale dans le foie de souriceaux nouveaux nés âgés de un à six jours, l'adénovirus portant l'ADNc de l'OTC entraîne une élévation de l'activité OTC hépatique dans 70 % des cas (Tableau I). Cette activité a été détectée un mois après injection et des analyses à très long terme sont en cours. Elle est d'importance variable, ce qui peut être expliqué par la difficulté de contrôler le volume effectivement retenu par la masse hépatique après chaque injection. La variabilité peut aussi être due à des réactions immunologiques se produisant chez certains animaux. Lorsque l'activité atteint, chez l'animal injecté, 20 % de celle observée chez la souris sauvage (animaux 1 et 2, Tableau I), une correction des autres traits phénotypiques est aussi obtenue, c'est-à-dire que l'hypotrophie et l'absence de pelage ne sont plus observés (figure 4). Dans une autre série d'expériences, l'efficacité de la thérapie a été testée par dosage de l'oroturie. L'une des conséquences de la mutation de l'OTC est que l'un des substrats non transformé, le carbamylphosphate, s'accumule, quitte la mitochondrie et suit la voie de synthèse des pyrimidines.

\* La transduction est l'introduction dans une cellule d'un fragment d'ADN étranger véhiculé par un virus.

## RÉFÉRENCES

18. Morgan JR, Barrandon Y, Green H, Mulligan R. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. *Science* 1987; 237: 1476-9.
19. Yu SF, Ruden TV, Kantoff PW, et al. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 3194-8.
20. Stuhlmann H, Cone R, Mulligan RC, Jaenisch R. Introduction of a selectable gene into different animal tissue by a retrovirus recombinant vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7151-5.
21. Miller AD, Eckner RJ, Jolly DJ, Friedmann T, Verma IM. Expression of a retrovirus encoding human HPRT in mice. *Science* 1984; 225: 630-2.
22. Kantoff PW, Kohn DB, Miysuya H, et al. Correction of adenosine deaminase deficiency in cultured human T and B cells by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6563-7.
23. Belmont JW, Henkel-Tiggles J, Chang SMW, et al. Expression of human adenosine deaminase in murine haematopoietic progenitor cells following retroviral transfer. *Nature* 1986; 322: 385-8.
24. Panthier JJ, Condamine H. La mutagenèse insertionnelle chez la souris. *médecine/sciences* 1988; 4: 568-75.
25. Gridley T, Soriano P, Jaenisch R. Insertional mutagenesis in mice. *TIG* 1987; 3: 162-6.
26. Rodriguez RL, Denhart DT. Vectors, a survey of molecular cloning vectors and their uses. Butterworth, 1988.
27. St-Louis D, Verma IM. An alternative approach to somatic cell gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3150-4.
28. Wu GY, Wu CH. Receptor mediated gene delivery and expression *in vivo*. *J Biol Chem* 1988; 263: 14621-4.
29. Dubensky TW, Campbell BA, Vilarreal LP. Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7529-33.
30. Ghosh-Choudhury G, Graham FL. Stable transfer of a mouse dihydrofolate reductase gene into a deficient cell line using human adenovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 147: 964-73.
31. Karlsson S, Doren KV, Schweiger SG, Nienhuis AW, Gluzman Y. Stable gene transfer and tissue specific expression of a human globin gene using adenoviral vectors. *EMBO J* 1986; 9: 2377-85.
32. Ballay A, Levrero M, Buendia MA, Tiollais P, Perricaudet M. *In vitro* and *in vivo* synthesis of the hepatitis B virus surface antigen and of a receptor for polymerized human serum albumin from recombinant human adenoviruses. *EMBO J* 1985; 4: 3861-5.
33. Morin JE, Ubeck MD, Borton JE, Conley AJ, Hung PP. Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigen in hamster. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4626-30.
34. Cavard C, Grimber G, Chasse JF, et al. Correction d'un déficit enzymatique murin par transfert de gène. *médecine/sciences* 1987; 3: 38-40.
35. Cavard C, Grimber G, Dubois N, et al. Correction of mouse ornithine transcarbamylase deficiency by gene transfer into the germ line. *Nucleic Acid Res* 1988; 16: 2099-110.

La saturation de cette voie métabolique entraîne une acidurie orotique qui atteint 20  $\mu\text{mol/h/mg}$  de créatinine. 80 % des animaux infectés testés ont une acidurie orotique considérablement abaissée, comprise entre 1,4 et 6  $\mu\text{mol/h/mg}$  de créatinine.

### Une voie ouverte...

Ces résultats préliminaires démontrent qu'il est possible d'utiliser un adénovirus recombinant pour corriger, de façon partielle, un déficit enzymatique par thérapie génique somatique.

**Perspectives de thérapie génique somatique du déficit en OTC chez l'homme.** Le déficit en OTC est le trouble héréditaire du cycle de l'urée le plus fréquemment observé (de l'ordre de 1/75 000 naissances). Lorsque le déficit est total, l'affection est le plus souvent mortelle dès les premiers jours de vie. Elle est relativement mieux supportée dans le cas des déficits partiels chez le garçon hémizygote et chez les filles hétérozygotes. Cependant à l'occasion d'un hypercatabolisme dû à une infection banale, à une intervention chirurgicale ou à une absorption importante de protéines, des accidents hyperammoniémiques à l'origine de comas irréversibles sont observés. Actuellement le traitement repose sur un

contrôle de l'apport protéique et l'apport de substances capables de fixer l'ammoniaque tel le benzoate de sodium. Il comporte en urgence des exsanguino-transfusions permettant l'élimination de l'ammoniaque excédentaire. La possibilité d'introduire *in vivo*, après qu'un diagnostic anténatal ou postnatal a été effectué, le gène gouvernant la synthèse d'une OTC normale serait une réelle thérapeutique. Les résultats obtenus sur le modèle animal sont encourageants mais les problèmes que posent chez l'homme l'infection par un adénovirus recombinant restent importants.

1. Quelles sont les conséquences d'une infection par un adénovirus? Une complémentation entre l'adénovirus recombinant défectif pour la réplication et un autre adénovirus est-elle possible et grave?

2. Les perturbations qui peuvent résulter de l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire sont-elles dangereuses?

3. La présence d'une activité OTC dans des tissus où elle n'est pas habituellement présente est-elle néfaste?

4. Le niveau d'expression obtenu est-il suffisant et stable?

En ce qui concerne la première question il semble que l'infection par un adénovirus soit chez l'homme non immunodéprimé, tout à fait bénigne.

Tableau I

ACTIVITÉS OTC DÉTECTÉES A UN MOIS DANS LE FOIE DES ANIMAUX INJECTÉS PAR VOIE TRANSCUTANÉE ENTRE UN ET SIX JOURS DE VIE

Animaux mutés injectés	Activité OTC	ADN adénoviral
1	22,3	nd*
2	12,1	+
3	9,6	+
4	7,4	+
5	6,4	+
6	2,3	nd
7	1,1	nd
Animaux mutés non injectés	1,7 +/- 0,3	
Animaux normaux	52,1 +/- 2,6	

L'activité OTC est déterminée d'après la méthode de Snodgrass modifiée [34, 35] par la quantité de citrulline produite et est exprimée en  $\mu\text{mol/h/mg}$  de protéines. Les valeurs de l'activité OTC des animaux sauvages et mutés correspondent à une moyenne sur 30 dosages effectuées sur des animaux différents. L'ADN adénoviral a été détecté par la technique d'amplification (PCR). \* nd : non déterminé.



Figure 4. **Correction partielle du phénotype muté *spf-ash* après injection de l'adénovirus recombinant.** Les deux animaux sont âgés de dix jours. L'animal blanc (a) à la fourrure plus développée, a reçu  $10^5$  particules virales en transcutané à 1 jour de vie. La fourrure de l'animal muté (b) est beaucoup plus clairsemée.

Par conséquent, l'éventualité même d'une complémentation rendant le virus recombinant infectieux n'apparaît pas comme dramatique.

En ce qui concerne la mutagenèse insertionnelle, il n'a jamais été démontré que des séquences *enhancers* de l'adénovirus pouvaient activer un oncogène, mais on ne peut cependant exclure cette éventualité. De plus, la destruction d'un gène par l'insertion peut aussi survenir, entraînant alors une mutation hétérozygote. Une telle thérapie génique somatique ne peut donc être envisagée qu'après évaluation des risques encourus par la mutagenèse insertionnelle et des risques résultant d'une absence de traitement.

Le problème des éventuels effets délétères de l'activité OTC dans les différents organes peut être résolu par l'utilisation de séquences capables de spécifier une synthèse de l'enzyme dans les tissus hépatiques et intestinaux, organes dans lesquels une activité OTC est normalement présente. L'utilisation de tels promoteurs peut en outre permettre l'obtention, spécifiquement dans ces organes, de niveaux d'expression plus importants. Il reste à démontrer qu'une expression suffisante pour maintenir

la correction phénotypique du déficit peut être obtenue de façon durable. Des résultats préliminaires obtenus sur un nombre encore limité d'animaux permettent d'affirmer qu'une stabilité à un an peut être obtenue.

Enfin l'utilisation du modèle animal peut permettre de préciser à quel stade il est préférable de réaliser l'infection (*in utero* ou après la naissance) et sous quelle forme (une ou plusieurs injections, en intraveineuse ou par voie péritonéale) de façon à augmenter l'efficacité d'infection, à diminuer d'éventuelles réactions immunologiques et à obtenir une augmentation de l'activité OTC assez précoce pour éviter le désordre métabolique provoqué par le déficit enzymatique en cause.

En conclusion, nos résultats démontrent la possibilité d'utiliser un adénovirus recombinant pour corriger un déficit enzymatique chez l'animal. Ainsi l'adénovirus humain, par ses propriétés de croissance et de manipulation aisées, par l'absence de pouvoir tumorigène chez l'homme, peut constituer un nouvel outil de thérapie génique somatique, potentiellement utilisable chez l'homme ■

## Summary

### Adenovirus as vector for gene therapy

Recombinant adenoviruses have proved to be efficient for the stable transfer of genes into deficient cell lines. These results prompted us to test whether or not adenovirus could be used as a vector to express genes which are defective in a mutant animal. The *spf-ash* ornithine transcarbamylase (OTC) mutant strain of mice is characterized by a reduction in the amount of OTC activity, OTC protein, and specific OTC mRNAs resulting in hyperammonemia, pronounced orotic aciduria, growth retardation and sparse fur until weaning. Using a recombinant adenovirus which harbors the rat OTC cDNA under the control of the major late promoter of adenovirus, we report that OTC synthesis in the liver of injected mice is sufficient to lead to a decrease of orotic aciduria and to a normalization of the fur.

## RÉFÉRENCES

36. Krebs HA. The discovery of the urea cycle. In: Grisolia S, Bagueña R, Mayor F, eds. *The Urea Cycle*. New York: Wiley and Sons Interscience, 1976: 1-12.
37. Briand P, François B, Rabier D, Cathelineau L. Ornithine transcarbamylase deficiencies in human males: kinetic and immunochemical classification. *Biochim Biophys Acta* 1982; 704: 100-6.
38. Walser M. Urea cycle disorders and other hereditary hyperammonemic syndromes. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw Hill, 1983: 402-38.
39. Doolittle DP, Hulpert LL, Cordy C. A new allele of the sparse-fur gene in the mouse. *J Hered* 1974; 65: 194-5.

## TIRÉS A PART

M. Perricaudet.