

Thérapie génique des déficits immunitaires : approche expérimentale et premiers résultats cliniques

Alain Fischer
Geneviève
de Saint-Basile
Salima Hacein-Bey
Claire Soudais
James Di Santo
Marina
Cavazzana-Calvo

Les déficits immunitaires héréditaires sont considérés depuis longtemps comme un champ d'études privilégié de la thérapie génique. Ainsi le déficit en adénosine désaminase est la première maladie héréditaire à avoir fait l'objet d'un essai clinique de thérapie génique. Un bénéfice clinique n'a toutefois pas pu être observé. Plusieurs éléments peuvent expliquer ces résultats décevants, notamment la perte au moins partielle de l'avantage sélectif escompté des cellules transduites du fait du traitement concomitant par PEG-ADA et les capacités limitées des vecteurs rétroviraux d'origine murine utilisés pour transduire les cellules humaines. Des résultats encourageants ont été obtenus au cours d'expériences de transfert *in vitro* et dans la correction de modèles murins correspondant à divers déficits immunitaires. Des progrès dans la recherche en vectorologie et/ou dans la connaissance et la manipulation des cellules souches hématopoïétiques sont nécessaires à l'amélioration de l'efficacité de transduction.

Les déficits immunitaires héréditaires (DIH) ou plus exactement l'un d'entre eux – le déficit en adénosine désaminase (ADA) – est apparu comme une des premières cibles thérapeutiques possibles du transfert de gène. Cette situation s'explique par l'accessibilité des cellules cibles: la moelle osseuse et les particularités cliniques et génétiques du déficit en ADA. Si des progrès significatifs ont été accomplis, y compris sur le plan clinique, les problèmes non résolus demeurent nombreux, le ciblage des cellules

souches hématopoïétiques (CSH) n'étant pas le moindre.

Nous verrons à travers cet article que les DIH, du moins certains d'entre eux, constituent des modèles privilégiés pour la mise au point de méthodes de thérapie génique.

Problématique de la thérapie génique des DIH

Les DIH sont nombreux, on estime leur nombre à environ 80. La moitié d'entre eux au moins sont de pronostic létal en raison des complica-

ADRESSES

A. Fischer: professeur des universités, praticien hospitalier. G. de Saint-Basile: directeur de recherche à l'Inserm. S. Hacein-Bey: docteur ès sciences. C. Soudais: docteur ès sciences. J. Di Santo: chargé de recherche à l'Inserm. M. Cavazzana-Calvo: praticien hospitalier. Inserm U. 429, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

tions infectieuses, auto-immunes et malignes qu'ils engendrent. Ils justifient donc des approches thérapeutiques lourdes. La quasi-totalité d'entre eux sont curables par greffe de CSH. Cependant, si cette méthode thérapeutique a fait de grands progrès, les échecs restent trop fréquents. La minorité de patients (20-25 %) qui disposent d'un donneur familial HLA identique ont de très grandes chances de guérison ($\geq 90\%$) [1]; en revanche, les chances de succès de greffe provenant de donneurs HLA compatibles non apparentés ou familiaux partiellement HLA incompatibles sont moindres (40 % à 70 % en fonction de l'âge, de la maladie...) [1]. Une place potentielle existe donc pour d'autres formes de traitements dont la thérapie génique.

Les DIH concernent soit les lymphocytes T, soit les lymphocytes B, soit les cellules phagocytaires. Bien que les premiers comportent le pronostic le plus sévère, les trois groupes de maladies justifient des efforts de mise au point de traitement par transfert de gène. Les progrès de la génétique des DIH sont tels que les gènes correspondant à plus de la moitié des DIH sont aujourd'hui identifiés; il s'agit en particulier de la plupart des DIH graves [2-7]. C'est le cas de la plupart des déficits immunitaires combinés sévères (DICS), du syndrome de Wiskott-Aldrich, du syndrome hyper-IgM lié à l'X, de l'agammaglobulinémie liée à l'X, des granulomatoses septiques chroniques...

Bien sûr, chaque maladie exige une réflexion particulière concernant l'adéquation et les difficultés spécifiques à un traitement par transfert de gène. Des éléments aussi différents que la taille du gène, les modalités de son expression tissulaire et surtout de sa régulation, la fonction du produit du gène, le pronostic de la maladie, l'efficacité d'éventuelles alternatives thérapeutiques interviennent. Cette discussion ne sera abordée ici que pour un petit nombre d'exemples.

Deux grandes stratégies peuvent être envisagées (en dehors de cas particuliers): la correction de l'anomalie génétique dans les CSH ou l'introduction d'une copie du gène normal dans les cellules différenciées du système

immunitaire. La première approche – de loin la plus ambitieuse – repose sur la notion aujourd'hui admise de l'existence d'un *pool* de CSH douées de capacité d'autorenouvellement. Ainsi, l'intégration d'un transgène dans ces cellules et son expression permettrait d'obtenir une correction définitive de la maladie causale à condition que l'expression du transgène soit stable [8, 9]. Les difficultés sont à la hauteur de l'objectif. En effet, ces cellules – en petit nombre et très mal caractérisées, en particulier chez l'homme – sont en G_0 pour la plupart d'entre elles. Les vecteurs actuellement disponibles (*voir ci-dessous*) ne permettent pas d'infecter efficacement ces cellules. Nous ne savons également pas comment mettre en cycle les CSH pluripotentes, sans induire de différenciation.

La seconde stratégie n'a de sens que si les cellules mûres ont une longue durée de vie. C'est le cas des lymphocytes T dont il est, de plus, aisé d'induire la mise en cycle *ex vivo*. Les résultats obtenus par M. Blaese dans le traitement du déficit en ADA indiquent que cette approche doit être sérieusement prise en considération à chaque fois que cela est possible [10]. Cela limite toutefois son emploi aux DIH avec lymphocytes T présents ou inductibles (comme dans le déficit en ADA) mais pathologiques. Cette situation est rarement rencon-

trée. Bien que moins exploré à ce jour, le ciblage des lymphocytes B (ou de leurs précurseurs) ou des monocytes peut être envisagé.

Malgré l'obstacle majeur inhérent à la biologie des CSH, les chercheurs ne se sont pas découragés à l'idée de mettre au point un traitement par transfert de gène dans des précurseurs hématopoïétiques de certains DIH. Il s'agit en premier lieu de DIH caractérisés par un défaut de différenciation cellulaire. En effet, on peut, dans ces situations, escompter procurer un avantage sélectif de croissance aux cellules transduites (*Tableau I*). Cette hypothèse a reçu le soutien d'un certain nombre d'observations et de faits expérimentaux dont certains seront détaillés plus loin dans la discussion du DICS lié à l'X. Pour plusieurs DIH liés à l'X, on observe, chez les conductrices, que seuls les lymphocytes dont le chromosome X actif porte une copie normale du gène sont détectables (exemple: lymphocytes B dans l'agammaglobulinémie liée à l'X). Dans cette situation, les conductrices ne souffrent pas de DIH [7]. En d'autres termes, 50 % de cellules précurseurs génétiquement normales (voire moins en fonction du degré de «lyonisation») suffisent. Nous avons mis en évidence *in vitro* un avantage de croissance conféré aux lymphocytes B de patients atteints de DICS lié à l'X après transfert du gène défi-

Tableau I	
DÉFICITS IMMUNITAIRES HÉRÉDITAIRES DONT LA CORRECTION POURRAIT ÊTRE FAVORISÉE PAR UN AVANTAGE PROLIFÉRATIF DES CELLULES TRANSDUITES	
Avantage sélectif conféré aux cellules transduites	Maladies
Fort	<ul style="list-style-type: none"> • DICS (lymphocytes T± NK, B, toutes formes)* • Agammaglobulinémie liée à l'X (lymphocytes B) • Déficit en ZAP 70 (lymphocytes T)
Intermédiaire	<ul style="list-style-type: none"> • Syndrome de Wiskott-Aldrich
Faible ou nul	<ul style="list-style-type: none"> • Granulomatoses septiques chroniques • Déficits d'adhésion leucocytaire • Défaut d'expression des molécules d'histocompatibilité HLA de classe II • Syndrome hyper IgM

* Annihilé dans le cas du déficit en ADA par un traitement substitutif enzymatique.

cient codant pour la sous-unité de récepteurs de cytokines gc (*m/s 1998, n° 4, p. 510*) [11]. Les arguments principaux reposent sur deux types d'observations cliniques: D. Kohn *et al.* ont montré, chez les patients atteints d'un déficit en ADA et dont les cellules du sang du cordon ont été infectées avec un vecteur rétroviral comportant le gène de l'ADA, que le pourcentage de lymphocytes T circulants transduits était supérieur d'un facteur de 10 à 100 au pourcentage de polynucléaires ou de monocytes transduits ([12] et *voir ci-dessous*). Même si cette fraction reste faible (~1% à 10%), cette observation démontre une prolifération préférentielle de lymphocytes T transduits. Enfin, une « thérapie génique » naturelle a été observée chez deux patients atteints respectivement d'un déficit en ADA et d'un DICS lié à l'X [13, 14]. Dans les deux cas, une inversion spontanée de la mutation causale, survenue dans un précurseur de lymphocytes T, a permis la correction partielle du DIH, dans la mesure où un nombre important de lymphocytes T sont présents, fonctionnels et expriment un répertoire diversifié [14]. Dans le cas du patient atteint du DICS lié à l'X, ces lymphocytes persistent depuis 4 ans. L'avantage sélectif conféré au précurseur d'inversion est tel qu'il a permis une prolifération cellulaire massive et la production d'un grand nombre de lymphocytes T distincts. Le *Tableau 1* indique dans quels DIH un tel avantage sélectif peut être espéré. L'analyse de transfert de gène des modèles animaux *in vivo* de DIH devrait éclairer ce point essentiel du rationnel des essais cliniques chez l'homme. Indépendamment de la problématique d'un possible avantage sélectif, comme pour beaucoup de maladies héréditaires, il est concevable qu'une correction d'un DIH dans une fraction faible de cellules (~5% à 10%) puisse être suffisante. Cela est démontré par l'absence de complications infectieuses observée chez les conductrices de granulomatose septique liée à l'X dont 5% à 10% des polynucléaires neutrophiles seulement sont normaux, ou, de façon plus indirecte, par l'absence de déficit immunitaire chez des sujets porteurs de mutations du gène de l'ADA qui préserve une activité enzyma-

tique résiduelle \geq à 10% de la normale [15]. Il s'agit ici cependant d'une expression réduite dans toutes les cellules et non d'un nombre diminué de cellules normales.

Le transfert de gènes dont les produits s'expriment dans les cellules du système immunitaire comporte des dangers spécifiques qu'il convient d'examiner. Deux situations doivent être considérées: la correction d'un déficit dans des lymphocytes T périphériques peut conférer à ces cellules des propriétés pathologiques. Ainsi, chez l'animal, l'introduction dans des cellules déficientes du gène codant pour une sous-unité du complexe de transduction CD3 associé au récepteur T pour l'antigène restaure une capacité d'activation optimale. Cependant, parmi ces lymphocytes T qui se sont différenciés dans le thymus, certains lymphocytes autoréactifs n'ont pu être normalement éliminés (processus dit de sélection négative) en raison de leur déficit d'expression de CD3. De ce fait, les capacités autoréactives des cellules déficientes sont latentes en périphérie et peuvent s'exprimer après transfert du gène [16]. Tout DIH (ou autre situation pathologique telle que peut-être l'infection par le VIH) – dans lequel les processus de sélection thymique sont perturbés et des lymphocytes T périphériques pourraient être les cibles de traitement par transfert de gène – expose à ce risque.

L'expression non physiologiquement contrôlée, donc inappropriée ou excessive, des gènes inducteurs de prolifération cellulaire est susceptible d'induire un risque de complication auto-immune ou surtout tumoral. Ainsi, en théorie, la surexpression du gène *btk* (*lymphocyte B tyrosine kinase*) déficient dans l'agammaglobulinémie liée à l'X, est susceptible d'induire une activation excessive des lymphocytes B voire un lymphome. Ce risque n'est pas que théorique. Récemment, l'équipe de M.K. Brenner a montré que la correction du déficit murin en ligand de CD40 (responsable chez l'homme du syndrome hyper-IgM) par introduction du gène dans les CSH provoque des tumeurs lymphoïdes thymiques [17]. L'expression membranaire constitutive (donc dérégulée) du ligand de CD40 induit une prolifération lymphomateuse!

Quels vecteurs pour la thérapie génique des DIH?

La grande majorité des expériences rapportées à ce jour, lors de transferts de gènes *in vitro* ou *ex vivo*, ont été effectuées en utilisant comme vecteur un rétrovirus, habituellement dérivé de Moloney. Les avantages potentiels de ces vecteurs sont connus: ils permettent une intégration du provirus dans le génome de cellules en division, et ainsi la répllication du provirus dans les cellules filles [18]. Les risques de mutagenèse insertionnelle en l'absence de virus compétents pour la répllication paraissent très faibles. Ces vecteurs ont été utilisés avec succès pour l'introduction et l'expression, sous le contrôle de promoteurs viraux ou intrinsèques, de gènes de DIH dans des lymphocytes et des précurseurs hématopoïétiques *in vitro*, dans des modèles murins *in vivo* [19], et en clinique pour le transfert de gènes (ADA) *ex vivo* dans des lymphocytes T [10, 20]. En revanche, pour les raisons déjà indiquées, l'efficacité de transfert dans les CSH humaines est médiocre ou nulle (*voir ci-dessous* et [12, 20, 21]).

L'expression d'un transgène véhiculé par un vecteur rétroviral peut être prolongée. Cependant, il n'est pas rare d'observer l'extinction de son expression liée à la méthylation du transgène. Cette extinction ne paraît pas *a priori* aujourd'hui prédictible. Malgré ces obstacles majeurs, l'emploi de ces rétrovirus dans le traitement par transfert de gène des DIH conserve à notre sens un intérêt pour trois raisons: (1) ils sont relativement efficaces pour le transfert de gènes dans les lymphocytes T mûrs; (2) ils sont susceptibles d'infecter efficacement des précurseurs lymphoïdes en cycle capables de donner naissance à un grand nombre de lymphocytes à longue durée de vie (*figure 1*); (3) enfin, leur efficacité est susceptible d'être améliorée par un ciblage plus efficace à l'aide d'enveloppes modifiées (pseudotypes ou constructions artificielles) [22]. On ne peut totalement exclure non plus la mise au point de méthode de mise en cycle des CSH humaines qui permettrait l'utilisation des vecteurs rétroviraux classiques.

Des progrès sensibles semblent être survenus dans la mise au point de vecteurs permettant l'infection et l'intégration dans le génome dans des cellules non en cycle. L'adénovirus associé, malgré les difficultés de production à large échelle, est prometteur. Il s'agit de parvovirus non pathogène en l'absence de co-infection par un adénovirus. Il peut être produit à des titres relativement élevés. Son intérêt réside principalement dans sa capacité de s'intégrer dans des cellules qui ne sont pas en division [23]. Des expériences d'infection de cellules CD34 ont montré des résultats encourageants puisque une fraction importante ($\geq 50\%$) peut être transduite. La persistance de l'expression d'un transgène (et de son intégration) reste plus incertaine. Il a été ainsi montré récemment que des lymphocytes T humains issus *ex vivo* de cellules CD34⁺ infectées par un adénovirus associé n'expriment plus le transgène au-delà de 35 jours. Ces résultats suggèrent la probable absence d'intégration du virus [24]. Les conditions d'utilisation doivent donc être précisées. Des expériences de transfert *in vitro* de gène de DIH ont été effectuées avec un certain succès [25]. Une application prometteuse de l'utilisation des adénovirus associés consiste en l'obtention d'événements de recombinaison homologue de façon non rare (1% de cellules fibroblastiques) comme cela est démontré récemment pour le gène

HPRT [26]. L'efficacité de cette stratégie, en ce qui concerne les cellules souches hématopoïétiques, implique à nouveau une intégration effective. L'utilisation d'un lentivirus caprin ou humain (VIH) – si le pouvoir pathogène du dernier peut être supprimé – ouvre une perspective intéressante [27]. Ainsi, un vecteur VIH a permis d'obtenir l'expression stable d'un transgène, non seulement dans des cellules Hela, mais aussi dans des fibroblastes de rats (dont le cycle cellulaire a été bloqué), des macrophages humains et des neurones. Enfin, les méthodologies de recombinaison homologue à l'aide d'oligonucléotides ARN/ADN [28, 29], encore à leur balbutiement, ouvrent cependant une perspective de recherche parfaitement adaptée aux DIH, lorsque les mutations faux-sens des gènes concernés le permettent. Il n'y a cependant pas (encore) à ce jour de données disponibles dans la littérature concernant: (1) les DIH et (2) les CSH.

En l'absence de système d'analyse *in vitro* de la différenciation des CSH humaines, le recours à des modèles de souris immunodéficientes capables, dans une certaine mesure d'accepter des greffes de cellules hématopoïétiques humaines, permet de tester l'efficacité à long terme de transfert de gène dans d'éventuelles CSH humaines. L'emploi des souris beige/nude/scid, scid/nod et sand doute *gc(-)/Rag-2(-)* permet ces expériences [30, 31]. C'est en utili-

sant ces modèles que le potentiel de CSH fœtales, ou issues du sang de cordon, à reconstituer l'hématopoïèse humaine après transduction, a été démontré comme étant supérieur à celui des CSH de la moelle osseuse de sujets adultes. Toutefois, ces modèles ne permettent pas d'étudier la différenciation des lymphocytes T, à moins d'implanter également un thymus fœtal humain [31], un obstacle sérieux dans le contexte d'application aux déficits immunitaires.

Quels résultats pour quelles maladies ?

• Le déficit en adénosine désaminase (ADA)

Le déficit en ADA a le premier attiré l'intérêt de ceux qui cherchaient à mettre au point une utilisation thérapeutique du transfert de gène. Le caractère létal de la maladie, la relativement médiocre efficacité de la greffe de moelle osseuse lorsque l'on ne dispose pas d'un donneur HLA identique, l'identification précoce du gène, sa petite taille, son expression ubiquitaire et très peu réglée constituent autant d'éléments potentiellement favorables. Les premiers efforts ont cherché à induire l'expression d'un transgène dans les précurseurs hématopoïétiques, avec succès chez la souris et une très faible efficacité chez le singe. Cependant, l'infection de cellules lymphoïdes T périphériques s'est révélée une voie thérapeutique moins ambitieuse mais fructueuse et riche d'informations [10]. La stratégie consiste à transférer de l'ADNc du gène de l'ADA à l'aide d'un vecteur rétroviral dérivé de Moloney dans les lymphocytes T périphériques activés *ex vivo*. En effet, il est, dans une certaine mesure, possible d'induire la différenciation de lymphocytes T fonctionnels, au cours du déficit en ADA, par traitement substitutif régulier avec l'enzyme ADA stabilisée par du polyéthylène glycol [13]. En 1990, et pendant une période de 2 ans, Blaese *et al.* ont prélevé par aphérèse les lymphocytes T à 10 et 11 reprises respectivement chez deux patientes. Ils ont induit la prolifération des lymphocytes T *ex vivo* par anticorps anti-CD3 et anti-IL-2, puis infecté les lymphocytes T en

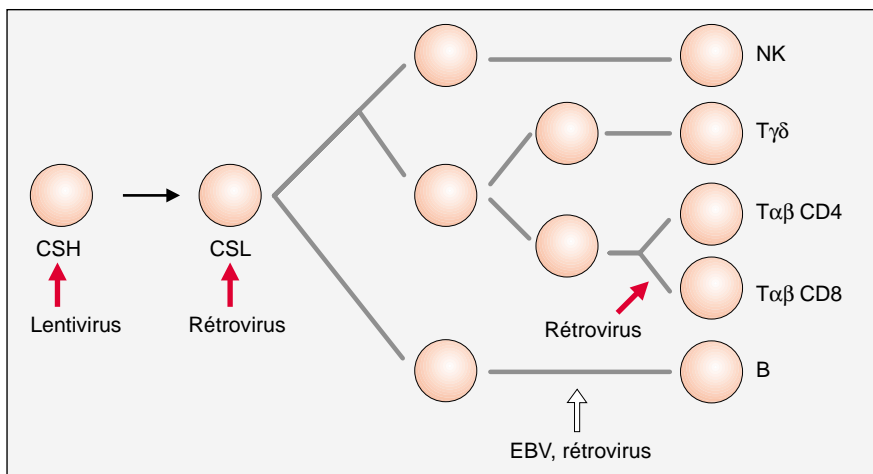


Figure 1. Vecteurs utilisables ou envisageables pour le transfert de gènes dans les cellules lymphoïdes à différents stades de leur différenciation. CSL : cellule souche lymphoïde ; CSH : cellule souche hématopoïétique ; NK : natural killer.

cycle et les ont réinjectés. Plusieurs enseignements peuvent être tirés de cette expérience : aucune toxicité n'a été constatée, et ce avec un recul de 8 ans, alors qu'un très grand nombre de lymphocytes T transduits ($> 10^{10}$) ont été injectés. Chez un patient chez lequel le taux d'infection des lymphocytes était compris entre 1 % et 10 %, l'effet observé a été spectaculaire : ascension significative du nombre de lymphocytes T circulants après 5-6 mois, et surtout maintien de ces lymphocytes T transduits (16 % à 25 %) plus de 5 ans après l'arrêt des réinjections. Ces lymphocytes T ont un répertoire diversifié et sont capables de réponse spécifique d'antigènes *in vitro* et *in vivo* (tests cutanés). Cependant, le traitement par le PEG-ADA n'a pas été arrêté, ce qui rend moins facile l'interprétation des données [10]. Un résultat identique avec un moindre recul a été obtenu chez un patient japonais [28]. Chez le second enfant, un taux d'infection plus faible des lymphocytes T (0,1 % à 1 %) n'a permis d'engendrer qu'une petite population de lymphocytes T transduits détectables *in vivo*. Ces résultats démontrent néanmoins la faisabilité clinique du transfert de gènes *ex vivo* dans des lymphocytes T à l'aide de vecteurs rétroviraux, et nous rappelent, de plus, que les lymphocytes T mémoires sont à longue durée de vie... Enfin, aucun phénomène d'extinction de l'expression du gène n'a été observé au moins chez deux enfants sur trois. L'extension potentielle de cette stratégie thérapeutique à d'autres indications est envisageable, sans méconnaître cependant les risques potentiels de l'induction de réponse auto-immune par correction d'un déficit fonctionnel de lymphocytes T non soumis à une sélection négative intrathymique (*voir ci-dessus*). Bordignon *et al.* ont également partiellement reproduit les résultats de M. Blaese dans le cadre d'un protocole plus complexe mêlant infection de lymphocytes T périphériques et de cellules médullaires avec deux vecteurs rétroviraux différents [20].

En l'absence, jusqu'à peu, de modèle animal de déficit en ADA (les souris KO ADA⁻ décèdent à la naissance) [33], trois essais cliniques ont cherché à évaluer l'efficacité du transfert

du gène de l'ADA dans les précurseurs hématopoïétiques. Dans l'expérience de Bordignon *et al.*, chez deux patients, il semble qu'une petite fraction de lymphocytes T transduits, engendrés par infection des cellules médullaires, puisse être détectée en périphérie en proportion plus importante que ne le sont les cellules myéloïdes transduites [20]. Ce résultat suggère qu'un avantage sélectif a favorisé les précurseurs des lymphocytes T. Cet effet ne paraît pas persister après arrêt transitoire du traitement par PEG-ADA. Avec D. Valerio et R. Levinsky, nous avons essayé de traiter trois patients par transfert du gène de l'ADA dans les cellules médullaires CD34⁺. L'effet observé fut modeste et transitoire puisque l'intégration du transgène (et non son expression) a été détectée au maximum pendant six mois dans les cellules médullaires et trois mois dans les cellules d'origine myéloïde en périphérie [21]. Rétrospectivement, deux facteurs rendent compte de cet échec : le faible titre de virus utilisé et le transport des cellules de Londres ou Paris à Amsterdam.

Enfin, D. Kohn *et al.* ont rapporté leur expérience du transfert du gène de l'ADA dans les cellules CD34 du sang de cordon de trois patients et leurs réinjections peu après la naissance [12]. L'intérêt de cette approche consiste à tester l'efficacité du transfert de gène dans des CSH douées d'un potentiel d'expansion plus important que les CSH médullaires. Quatre ans après le transfert du gène ADA, il est possible de détecter des leucocytes circulants ayant intégré le transgène chez les trois patients. Le pourcentage de lymphocytes T ayant intégré le transgène est de l'ordre de 1 % à 10 %, alors que pour les autres leucocytes, cette fréquence n'est que de 0,01 % à 0,1 %. Cette observation démontre l'existence d'un avantage sélectif conféré aux lymphocytes T transduits. Chez un patient, le traitement par PEG-ADA a été interrompu [34]. Il en est résulté, de façon surprenante, une diminution d'un facteur 100 du nombre de lymphocytes B et NK et la perte de la quasi-totalité des lymphocytes T non transduits. Malheureusement, en parallèle, la capacité de réponse lymphocytaire T à un antigène *in vitro* a été perdue, et il n'a

pas été observé d'expansion des lymphocytes T transduits. Ainsi, le niveau faible d'expression ne suffit pas à engendrer une correction suffisante du déficit immunitaire.

• Les autres déficits immunitaires combinés sévères (DICS)

Le caractère relativement décevant de ces résultats incite à la mise au point de méthodes de transferts de gènes plus efficaces et/ou à s'intéresser à d'autres déficits immunitaires.

Le DICS lié à l'X, provoqué par un défaut d'expression de la sous-unité du récepteur de cytokine gc, et son homologue de transmission autosomique récessive provoqué par un défaut d'expression de la kinase JAK-3 associée à gc constituent deux modèles particulièrement pertinents [7]. D'une part, ils constituent à eux deux 60 % à 70 % de toutes les formes de DICS. D'autre part, le déficit en gc ou JAK-3 provoque un blocage très précoce de la différenciation des lymphocytes T et NK (mais pas B) en empêchant l'induction de signaux de prolifération et de survie par respectivement l'IL-7 et l'IL-15 [7]. On peut donc vraisemblablement espérer que l'expression du transgène confère un avantage sélectif de prolifération aux précurseurs des lymphocytes T et NK. Enfin, ces gènes sont exprimés très précocement dans l'hématopoïèse, et cette expression persiste dans les différentes lignées. Il n'y a donc pas lieu de craindre l'effet d'une expression aberrante. On ne peut toutefois exclure l'hypothèse selon laquelle la surexpression de JAK-3, une kinase, pourrait induire des effets délétères. Il a été montré que le transfert de l'ADNc de gc, à l'aide d'un vecteur rétroviral de type MFG, permet de restaurer l'expression membranaire d'une protéine gc ou JAK-3 fonctionnelle dans les lymphocytes B déficients [11, 35-37] ainsi que l'expansion préférentielle des lymphocytes B transduits [11]. L'infection de cellules CD34 médullaires de patients déficients en gc par le même vecteur rétroviral permet d'obtenir *ex vivo* la différenciation en cellules NK (en présence de *stem cell factor* et d'IL-15) et en cellules T (en culture organotypique dans des lobes thymiques foetaux murins) [38, 39]. Nous avons mis à

profit les progrès des méthodologies de transfert de gène dans les cellules CD34: addition de ligand flt-3 (avec le SCF et l'IL-3) à la combinaison de cytokines requises pour induire la prolifération de cellules CD34 et utilisation d'un fragment de fibronectine qui favorise l'infection en augmentant la probabilité de contact entre cellule et virus [40]. Il est ainsi possible d'infecter efficacement 30% à 40% des cellules CD34⁺ CD38⁻ du sang du cordon ou 35% à 70% des cellules CD34 issues de la moelle osseuse de patients atteints de DICS lié à l'X. En parallèle, des expériences de transfert de gène *gc* ou *JAK-3* chez des souris déficientes ont permis d'observer la correction du déficit immunitaire sans toxicité particulière [41]. Dans le modèle *JAK-3*, il a de plus été montré que les lymphocytes exprimant *JAK-3* ont un avantage sélectif de survie sur les cellules non transduites [41]. L'utilisation du modèle du chien déficient en *gc* devrait apporter des informations complémentaires dans un modèle animal plus proche de la situation clinique [42]. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle un avantage sélectif suffisant est conféré aux progéniteurs transduits dans le contexte de ces deux maladies n'apparaît pas comme chimérique. La correction spontanée et durable (> 3 ans) d'un DICS lié à l'X par la survenue d'une mutation inverse dans un précurseur lymphoïde T donne bien sûr plus de poids à cette hypothèse [14]. Cette dernière observation suggère que l'infection de progéniteurs lymphoïdes (CSL) [43] (figure 1) qui sont en cycle, pourrait permettre une correction durable, bien que sans doute non définitive de ce type de déficit immunitaire. C'est en tout cas à partir de ces observations que nous, et d'autres, envisageons très prochainement de débiter un essai clinique chez des patients atteints de DICS lié à l'X [44]. Les cellules CD34 médullaires seront purifiées, infectées *ex vivo* en trois cycles de 24 heures par un vecteur MFG dans lequel le gène *gc* est sous le contrôle du LTR (*long terminal repeat*) viral, puis réinjectées sans autre traitement des patients. D'autres formes de DICS pourraient bénéficier d'une stratégie thérapeutique semblable (Tableau II). C'est le cas en particulier des déficits en protéines Rag-1 et Rag-2. L'absence de

l'un ou l'autre de ces produits inhibe l'étape initiale de la recombinaison des éléments V(D)J des gènes codants pour les chaînes α , β , γ et δ des récepteurs T pour l'antigène et des gènes codants pour les chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines. Il en résulte une absence de production de lymphocytes T et B [7]. Les modèles murins existent. Bien que l'expression des protéines Rag soit restreinte aux précurseurs lymphocytaires, l'expression constitutive de l'une d'entre elles devrait être sans conséquence puisque l'expression concomitante de RAG-1 et RAG-2 est nécessaire à leur fonction. Le déficit en purine nucléoside phosphorylase (PNP), dont l'action enzymatique est proche de celle de l'ADA, provoque un déficit quantitatif profond en lymphocytes T. La correction du déficit dans les lymphocytes T a été démontrée *in vitro* [45]. L'application *in vivo* se pose en des termes semblables au déficit en ADA en dehors de l'absence de traitement par substitution enzymatique. Le déficit en tyrosine kinase ZAP-70

provoque un défaut de différenciation de lymphocytes T CD8 et un défaut d'activation des lymphocytes T CD4. Taylor *et al.* ont montré que le transfert d'une copie fonctionnelle du gène *ZAP-70* dans des lymphocytes T CD4 *ZAP-70*⁻ transformés par HTLV1, restaure une signalisation normale *via* le complexe TCR/CD3 [46]. Compte tenu du phénotype du déficit immunitaire, le modèle est attractif bien que l'expression de *ZAP-70* dans d'autres cellules que les lymphocytes T puisse être délétère et doit être testée dans un modèle murin. Les déficits en sous-unités CD3 γ et ϵ responsables de déficits immunitaires des lymphocytes T soulèvent les mêmes questions [16, 47].

• Les autres déficits immunitaires

Pour d'autres déficits immunitaires, il a été montré que l'introduction dans les cellules déficientes d'une copie du gène normal corrige le déficit fonctionnel. C'est le cas du déficit immunitaire avec défaut d'expression des molécules HLA de classe II

Tableau II				
THÉRAPIE GÉNIQUE DES DÉFICITS IMMUNITAIRES COMBINÉS SÉVÈRES				
Maladie	Cellules déficientes	Modèle animal	Correction	Expérience clinique
DÉFICIT EN ADA	T, B, NK	Oui*	NF	1. T périphériques-efficacité partielle au long cours 2. CD34 moelle-échec 3. CD34 sang du cordon avantage sélectif obtenu mais insuffisant
γ c (DICS-X)	T, NK	Oui**	Oui	-
JAK-3 (DICS)	T, NK	Oui***	Oui	-
RAG-1, RAG2 (DICS)	T, B	Oui***	NF	-
ZAP 70	CD8 (CD4)	Oui***	NF	-
DÉFICIT EN CD3 γ ou ϵ	T	Oui***	NF	-
DÉFICIT en PNP	T	Non	-	-

NF: non fait.

* Souris dont le gène ADA a été invalidé, née de souris transgénique exprimant le gène de l'ADA dans le trophoblaste.

** Souris dont le gène γ c a été invalidé et race de chien naturellement déficient [7].

*** Souris dont le gène a été invalidé.

secondaire à un déficit du transactivateur CIITA [48]. L'application clinique paraît ici moins facilement envisageable dans l'état actuel de la technologie du transfert de gènes dans les CSH. On ne peut en effet attendre de l'expression des molécules HLA de classe II un avantage de croissance cellulaire. On peut toutefois envisager une approche thérapeutique plus sélective bien que transitoire. Elle consisterait à cibler *ex vivo* les cellules dendritiques (CD) que l'on peut aujourd'hui obtenir en grand nombre *ex vivo*. Les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigènes [49]. La réinjection de CD transduites pourrait ainsi restaurer la fonction des lymphocytes T CD4 de ces patients. On ne peut cependant à nouveau écarter totalement le risque d'observer des réponses immunes pathologiques secondaires à une anomalie des processus de sélection des lymphocytes T CD4.

De très beaux résultats ont été obtenus *in vitro* dans la correction d'anomalies héréditaires des cellules phagocytaires, responsables de déficits immunitaires graves. Il s'agit du déficit d'adhérence leucocytaire secondaire au déficit en $\beta 2$ -intégrines et des formes de granulomatoses septiques chroniques (GSC) provoquées par un déficit en NADPH oxydase pourvoyeuse de radicaux libres oxygénés [20, 51]. La transposition clinique s'avère difficile dans la mesure où ces maladies concernent les fonctions effectrices des phagocytes et non leur production. Ainsi, un premier essai clinique effectué par H. Malech *et al.*, chez des patients atteints de GSC dans lequel le gène déficient a été transféré *ex vivo* dans des cellules CD34, donne des résultats plutôt décevants : détection transitoire pendant quelques semaines de polynucléaires fonctionnels (producteurs de radicaux libres oxygénés) dont la fréquence maximale fut de 1 : 50 000 [51]. Même si l'on sait que la présence de quelques pourcents de cellules fonctionnelles serait suffisante à empêcher la survenue d'infections bactériennes, les méthodes actuellement disponibles sont encore loin du compte.

Enfin, deux déficits immunitaires ont une problématique intermédiaire entre les DICS et les déficits fonction-

nels des cellules phagocytaires : il s'agit du syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) et de l'agammaglobulinémie liée à l'X (XLA) [2-6]. Le WAS est un syndrome complexe responsable à la fois d'une thrombopénie périphérique sévère et d'un déficit immunitaire. Le gène déficient, *WASP*, est exprimé par toutes les cellules d'origine hématopoïétique et est impliqué dans l'organisation du cytosquelette cellulaire. Chez les conductrices du déficit, on observe une inactivation non liée au hasard de l'X dans l'ensemble des cellules d'origine hématopoïétique. Il est donc possible, bien qu'il n'existe pas de défaut de différenciation cellulaire dans le WAS, que les cellules transduites puissent bénéficier d'un avantage sélectif de croissance. La disponibilité d'un modèle murin permettra vraisemblablement de répondre à cette question.

L'XLA se caractérise par un déficit de lymphocytes B mûrs et donc par une agammaglobulinémie [2-6]. Le gène déficient code pour une kinase *ltk* impliquée dans la transmission de signaux induits par les immunoglobulines de membrane. Sa déficience bloque chez l'homme, mais pas chez la souris, la maturation lymphocytaire B, de façon approximative au stade pré B. Il est donc concevable et tentant de corriger ce défaut par transfert du gène *ltk*, susceptible de restaurer la maturation des cellules B. Bien que *ltk* soit aussi exprimée dans d'autres cellules d'origine hématopoïétique, les risques inhérents à une expression aberrante ou excessive d'une tyrosine kinase devront être sérieusement mesurés.

Conclusions

La discussion de la problématique de la thérapie génique dans une série d'exemples de déficits immunitaires héréditaires montre à quel point celle-ci varie de maladie à maladie et même peut-être de malade à malade. Il est ainsi possible que telle ou telle mutation du gène *gc* engendre une protéine exerçant un effet dominant négatif sur le transgène normal par exemple ! La disponibilité croissante de modèles animaux – essentiellement murins – devrait contribuer, cas par cas, à répondre aux questions posées. Il apparaît globalement que

dans l'état de développement des méthodes de transfert de gène dans les CSH, ou du moins les progéniteurs hématopoïétiques, on puisse raisonnablement espérer à court terme un effet bénéfique dans les quelques DICS dans lesquels un avantage sélectif de croissance cellulaire est établi. Pour les autres maladies, l'utilisation de nouveaux vecteurs de types AAV ou lentivirus (ou les approches de recombinaison homologue) devrait, à plus ou moins longue échéance, apporter d'éventuelles solutions. Logiquement, cependant, l'étape du traitement de DICS devrait contribuer à faire progresser nos connaissances sur le transfert de gène dans les cellules hématopoïétiques, au moins dans les précurseurs lymphoïdes. Quelques leçons pourront sans doute être retenues de ces modèles rares ■

RÉFÉRENCES

1. Buckley RH, Fischer A. Bone marrow transplantation for primary immunodeficiency diseases. London: Oxford University Press, 1999 (sous presse).
2. Schwarz K. WASPbase: a database of WAS- and XLT-causing mutations. *Immunol Today* 1996; 17: 496-502.
3. Vihinen M. BTKbase: XLA-mutation registry. *Immunol Today* 1996; 17: 502-6.
4. Puck JM. I2RGbase: a database of gamma c-chain defects causing human X-SCID. *Immunol Today* 1996; 17: 507-11.
5. Notarangelo LD, Peitsch MC. CD40Ibase: a database of CD40L gene mutations causing X-linking hyper-IgM syndrome. *Immunol Today* 1996; 17: 511-6.
6. Roos D. X-CGDbase: a database of X-CGD-causing mutations. *Immunol Today* 1996; 17: 517-21.
7. Fischer A, Cavazzana-Calvo M, De Saint-Basile G, *et al.* Naturally occurring primary deficiencies of the immune system. *Ann Rev Immunol* 1997; 15: 93-124.
8. Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 389: 239-42.
9. Kohn DB. Gene therapy for hematopoietic and lymphoid disorders. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 54-7.
10. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, *et al.* T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995; 270: 475-80.

RÉFÉRENCES

11. Hacein-Bey S, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, *et al.* gc gene transfer into SCID X1 patients B-cell lines restores high affinity IL-2 receptor expression and function. *Blood* 1996; 87: 108-16.
12. Kohn DB, Weinberg KI, Nolte JA, *et al.* Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with ADA deficiency. *Nature Med* 1995; 1: 1017-23.
13. Hirschhorn R, Yang DR, Israni A, Huie ML, Ownby DR. Somatic mosaicism for a newly identified splice-site mutation in a patient with ADA deficiency. *Nat Genet* 1996; 13: 290-5.
14. 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 J Med* 1996; 335: 1563-7.
15. Hirschhorn R. ADA deficiency. In: Rosen FS, Seligmann M, eds. *Immunodeficiencies, primary immunodeficiencies*. Harwood, CHUR: Academic Publishers, 1993: 177-98.
16. Fischer A, Malissen B. Natural engineered disorders of lymphocyte development. *Science* 1998; 280: 237-43.
17. Brown J, Topham D, Sangster MY, Zhao JF, Pattengale PK, Brenner MK. Correction of immunodeficiency in CD40 ligand knock out mice by modified marrow is followed by thymic lymphoproliferative disease. American Society of Hematology (abstract 1153). *Blood* 1997; 90: 262a.
18. Danos O, Mulligan RC. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6460-4.
19. Wilson JM, Danos O, Grossman M, Raullet DH, Mulligan PC. Expression of human ADA in mice reconstituted with retrovirus-transduced hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 439-43.
20. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, *et al.* Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 1995; 270: 470-5.
21. 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.
22. Cosset FL, Russell SJ. Targeting retrovirus entry. *Gene Ther* 1996; 3: 946-56.
23. Podsakoff G, Wong KK, Chatterjee S. Efficient gene transfer into non dividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J Virol* 1994; 68: 5656-66.
24. Gardner JP, Zhu H, Colosi PC, Kurtzman GJ, Scadden DT. Robust, but transient expression of adeno-associated virus-transduced genes during human T lymphopoiesis. *Blood* 1997; 90: 4854-64.
25. Fischer-Adams G, Wong Jr KK, Podsakoff G, Forman SJ, Chatterjee S. Integration of AAV vectors in CD34⁺ human hematopoietic progenitor cells after transduction. *Blood* 1996; 88: 492-504.
26. Russell DW, Hirata RK. Human gene targeting by viral vectors. *Nat Genet* 1998; 18: 325-30.
27. Naldini L, Blomer U, Galloy P, *et al.* *In vivo* gene delivery and stable transduction of non dividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-7.
28. Wang G, Seidman MM, Glazer PM. Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair. *Science* 1996; 271: 802-5.
29. Strauss M. The site-specific correction of genetic defects. *Nat Med* 1998; 4: 274-5.
30. Doa MA, Shah AJ, Crooks GM, Nolte JA. Engraftment and retroviral marking of CD34(+) and CD34(+) CD38(-) human hematopoietic progenitors assessed in immunodeficient mice. *Blood* 1998; 91: 1243-55.
31. Humeau L, Chabanon C, Firpo MT, *et al.* Successful reconstitution of human hematopoiesis in the SCID-hu mouse by genetically modified, highly enriched progenitors isolated from fetal liver. *Blood* 1997; 90: 3496-506.
32. Onodera M, Ariga T, Kawamura N, *et al.* Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with SCID caused by ADA deficiency. *Blood* 1998; 91: 30-6.
33. Blackburn MR, Datta SK, Kellems RE. ADA-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy exhibit a combined immunodeficiency. *J Biol Chem* 1998; 273: 5093-100.
34. 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.
35. Candotti F, Johnston JA, Puck JM, Sugamura K, O'Shea JJ, Blaese RM. Retroviral-mediated gene correction for X-linked SCID. *Blood* 1996; 87: 3097-102.
36. Taylor N, Uribe L, Smith S, Jahn T, Kohn DB, Weinberg K. Correction of IL-2 receptor function in X SCID lymphoblastoid cells by retrovirally mediated transfer of the gc gene. *Blood* 1996; 87: 3103-7.
37. Candotti F, Oakes SA, Johnston JA, Notarangelo LD, O'Shea JD, Blaese RM. *In vitro* correction correction of JAK-3 deficient SCID by retroviral-mediated gene transduction. *J Exp Med* 1996; 183: 2687-92.
38. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G, *et al.* Role of IL-2, IL-7 and IL-15 in natural killer cell differentiation from cord blood hematopoietic progenitor cells and from gc transduced SCID X1 bone marrow cell. *Blood* 1996; 88: 3901-9.
39. Hacein-Bey S, De Saint Basile G, Lemerle JP, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. SCF, FLT-3l, IL-7, IL-1a and IL-15 cytokines restores T-cell differentiation from gc(-) SCID-X1 hematopoietic progenitor cells in murine fetal thymic organ cultures. *Blood* 1999 (sous presse).
40. Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato J, Williams DA. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 1996; 2: 876-82.
41. 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.
42. Somberg RL, Robinson JP, Felsburg PJ. T lymphocyte development and function in dogs with X-linked SCID. *J Immunol* 1994; 153: 4006-15.
43. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997; 9: 661-72.
44. Bordignon C. A new chance for SCID gene therapy. *Nat Med* 1998; 4: 19-20.
45. Nelson DM, Butters KA, Markert ML, Reinsmoen NL, McIvor RS. Correction of proliferative responses in PNP-deficient T lymphocytes by retroviral-mediated PNP gene transfer and expression. *J Immunol* 1995; 154: 3006-14.
46. Taylor N, Bacon KB, Smith S, *et al.* Reconstitution of T cell receptor signaling in ZAP-70 deficient mice by retroviral transduction of the ZAP-70 gene. *J Exp Med* 1996; 184: 2031-6.
47. Sun JY, Pacheco-Castro A, Borroto A, Alarcon B, Alvarez-Zapata D, Regueiro JR. Construction of retroviral vectors carrying human CD3 γ cDNA and reconstitution of CD3 γ expression and T cell receptor surface expression and function in a CD3 γ -deficient mutant T cell line. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1041-8.
48. Baradley MB, Fernandez JM, Ungers G, *et al.* Correction of defective expression in MHC class II deficiency cells by retroviral transduction of CIITA. *J Immunol* 1997; 159: 1086-95.
49. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52.
50. Bauer Jr TR, Schwartz BR, Liles WC, Ochs HD, Hickstein DD. Retroviral-mediated gene transfer of the leukocyte integrin CD18 into peripheral blood CD34⁺ cells derived from a patient with leukocyte adhesion deficiency type I. *Blood* 1998; 91: 1520-6.
51. Malech HL, Maples PB, Whiting-Theobald N, *et al.* Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12133-8.

Summary

Gene therapy of primary immunodeficiencies: experimental approach and preliminary clinical results

Primary immunodeficiencies have been long considered as a possible experimental field for gene therapy. Adenosine deaminase (ADA) deficiency was the first inherited disease for which clinical gene therapy was performed. Infusion of T cells in which the ADA gene had been retrovirally transferred, led to sustained detection of transduced and functional T cells at least in 2 cases. ADA gene transfer into CD34 hematopoietic precursor cells was less successful although detection of transduced T cells 4 years after gene transfer has been reported. The low number of transduced T cells, however, was not sufficient to provide clinical benefit. Many factors could have influenced the outcome of these clinical studies, including partial loss of expected selective advantage caused by concomitant

PEG-ADA therapy and, obviously, limitations of presently available murine-derived retroviral vectors to transduce human cells. Possible applications of gene transfer to the treatment of other forms of SCID including *gc* and JAK-3 deficiency are herein discussed based on encouraging *in vitro* and *in vivo* experimental results. It is likely that advances in vector technology and/or hematopoietic stem cell manipulation will be required to improve transduction efficiencies in hopes of achieving significant clinical benefits of gene therapy for the many primary immunodeficiencies. This will be particularly important for situations in which transgene expression will not confer a selective growth or survival advantage, as for instance in functional deficiencies in phagocytic cells.

TIRÉS À PART

A. Fischer.

