

Thérapie génique cutanée : acquis et perspectives

Joëlle Vailly
Jean-Paul Ortonne
Guerrino Meneguzzi

Les techniques de thérapie génique, bien que trouvant aujourd'hui leurs limites dans les systèmes de transfert et d'expression, ouvrent un champ prometteur de la recherche médicale. La peau, qui en offre un bon modèle, a été la cible d'un nombre croissant d'expérimentations dans ce domaine. Dans le cas des génodermatoses, trois types de pathologies ont été plus particulièrement étudiés : les épidermolyses bulleuses, les ichtyoses récessives et le xeroderma pigmentosum. Plus généralement, les applications de la thérapie génique cutanée trouvent leur prolongement dans bien d'autres domaines tels que la cicatrisation, la thérapie des désordres systémiques, l'immunomodulation cutanée, et la thérapie des cancers de la peau. L'avenir de ces approches diverses et attirantes repose sur la mise au point de méthodes de transfert sûres et efficaces, et sur des études complémentaires utilisant des modèles animaux.

L'identification de nombreuses mutations génétiques responsables de diverses pathologies héréditaires a contribué au développement des recherches en matière de thérapie génique somatique. Néanmoins, ces techniques soulèvent encore des difficultés majeures. La première a trait aux problèmes d'efficacité de transfert de l'ADN dans les cellules cibles *in vivo*, souvent difficiles à atteindre. Cette restriction oblige dans certains cas à procéder au transfert de gènes dans des cellules cultivées *ex vivo* et à réimplanter ces cellules sur l'organisme, et pose alors des problèmes liés à la culture cellulaire et aux greffes. La deuxième difficulté majeure a trait à l'expression des transgènes, souvent faible et à

durée limitée, ce qui conduit à renouveler fréquemment l'intervention. C'est pourquoi la vague d'engouement exubérante et irrationnelle qui a accompagné le développement de la thérapie génique a été suivie par des considérations négatives tout aussi excessives. Pourtant, les applications potentielles de la thérapie génique sont telles qu'elles incitent à rechercher des solutions pour surmonter ces obstacles [1].

La peau : un bon modèle en thérapie génique

La peau, et notamment l'épiderme, offre un modèle de recherche particulièrement adapté pour des expé-

ADRESSE

J. Vailly, J.P. Ortonne, G. Meneguzzi :
Inserm U. 385, Faculté de médecine, avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France.

riences de thérapie génique somatique. En effet, elle présente divers avantages: les conditions de culture permettant la croissance rapide des kératinocytes sont bien maîtrisées; des kératinocytes à forte capacité multiplicative, dérivés directement des cellules souches peuvent être maintenus en culture et transduits; la culture de kératinocytes est utilisée en routine pour réaliser des greffes autologues dans le cas de traitements de grands brûlés avec maintien de la greffe à long terme; dans le cas de problèmes tels qu'une réaction de rejet ou de toute autre complication, la greffe peut être facilement enlevée et d'une façon générale elle constitue un tissu particulièrement accessible pour les transferts de gènes curatifs *in vivo*. En outre, la thérapie génique cutanée répond à des objectifs divers ayant des implications dans le traitement des génodermatoses, des troubles de la cicatrisation, des affections systémiques, dans la modulation de la réponse immunitaire, et les cancers de la peau.

Thérapie génique des maladies héréditaires de la peau

Dans cet article, nous développerons plus particulièrement les aspects concernant ces maladies, qui rassemblent aujourd'hui les projets les plus élaborés. Des progrès considérables ont été récemment réalisés dans l'élucidation des bases moléculaires de pathologies héréditaires monogéniques de la peau. Ces avancées permettent d'envisager un transfert de copies normales du gène affecté dans les cellules de patients. Cette complémentation est possible dans le cas de pathologies récessives pour lesquelles la réexpression d'une protéine est suffisante pour restaurer la fonction affectée, alors que dans le cas de maladies dominantes, le gène défectueux entrave l'activité du transgène normal et ne permet pas de corriger le phénotype. Pour les pathologies dominantes, la correction *in situ* du défaut génétique paraît donc être la méthode adéquate, mais elle n'a pas

pour le moment rencontré de succès avec les kératinocytes. Le *Tableau I* présente la liste des maladies héréditaires de la peau, ou génodermatoses, pour lesquelles une thérapie génique peut être envisagée. En ce qui concerne les maladies récessives, trois types de pathologies ont été plus particulièrement étudiées: les épidermolyses bulleuses, les ichtyoses récessives, et les *xeroderma pigmentosum*.

Les épidermolyses bulleuses héréditaires (EB) sont des génodermatoses qui se caractérisent sur le plan clinique par une fragilité cutanée accrue conduisant à la formation de clivages (bulles) dans la peau [2, 3]. Les épidermolyses bulleuses jonctionnelles ou EBJ, dont la zone de clivage se situe à la jonction dermo-épidermique de la membrane basale, comportent des variétés létales avec atteinte des épithéliums respiratoires et digestifs (EBJ de type Herlitz ou H-EBJ), et des variétés légères, pour lesquelles les décollements intéressent

Tableau I
GÉNODERMATOSES SUSCEPTIBLES DE BÉNÉFICIER D'UNE APPROCHE CURATIVE PAR THÉRAPIE GÉNIQUE [42]

Maladies	Gènes associés	Transmission
EB dystrophique	Collagène type VII	AR/AD
EB jonctionnelle	Laminine-5	AR
	Collagène XVII	AR
	Intégrine b4	AR
Ichthyose lamellaire	Transglutaminase 1	AR
Ichthyose liée chr. X	Sulfatase stéroïde	AR
Xeroderma pigmentosum	Groupes X-A, X-B, X-C, X-D	AR
EB jonctionnelle	Intégrine $\alpha 6$	AR
EB simplex	Kératines 5 & 14	AD
EB simplex avec DM	Plectine	AR
Hyperkératose épidermolytique	Kératines 1 & 10	AD
Ichtyose bulleuse de Siemens	Kératine 2e	AD
KPP épidermolytique	Kératine 9	AD
KPP non épidermolytique	Kératine 16	AD
KPP strié	Desmogléine 1	AD
Pachyonychia congenita	Kératine 6a & 16/17	AD
Maladie de Darier	ATP2A2	AD
Syndrome du Nevus basocellulaire	<i>Patched</i>	AD
Syndrome de Vohwinkel	Connexine 26	AD/AR
Syndrome de Vohwinkel (variant)	Loricrine	AD
XP Groupe E	DDB2	AR
XP Groupe F	ERCC1/ERCC4	AR
XP Groupe G	ERCC5	AR
XP variant	ADN polymérase eta	AR

(En gras: pathologies pour lesquelles des études de thérapie génique ont été entreprises.)
EB: Épidermolyse bulleuse héréditaire; DM: Dystrophie musculaire; KPP: Kératodermie palmoplantaire; XP: Xeroderma pigmentosum; AR: autosomique récessive; AD: autosomique dominante; DDB2: Damaged DNA Binding Protein 2; ERCC: Excision Repair Cross Complementation.

des surfaces limitées aux régions soumises à des frottements [2]. La mise au point d'une thérapie génique somatique pouvant s'appliquer aux formes non létales d'EBJ paraît tout à fait justifiée en raison des handicaps considérables causés par cette pathologie et de l'absence de thérapie alternative.

L'H-EBJ et certaines formes légères d'EBJ ont été associés au défaut d'expression de la laminine-5, qui constitue un ligand d'adhérence des cellules basales des épithéliums stratifiés et transitionnels, composé de trois chaînes ($\alpha 3$, $\beta 3$, et $\gamma 2$) [4]. D'autres formes d'EBJ (l'EBJ avec atrésie pylorique ou EBJ-AP et l'EBJ non Herlitz ou EBJ non H) ont également été associées à des mutations dans les gènes codant pour des protéines (intégrine $\alpha 6\beta 4$ et collagène XVII/ BP180 respectivement) entrant dans la composition des hémidesmosomes, structures d'attachement stables des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire [5, 6] (figure 1).

Même si la thérapie génique se conçoit dans le cadre des EBJ non H, les premiers essais ont été concentrés sur l'inversion phénotypique des lignées H-EBJ, puisqu'elles présentent des défauts d'adhérence extrêmes et donc des plus repérables. Une inversion phénotypique au moins partielle des kératinocytes immortalisés transduits par l'ADNc sauvage correspondant au gène muté (LAMC2) dans ces cellules a pu être obtenue [7]. Une inversion phénotypique des kératinocytes EBJ-AP et non H immortalisés a également été obtenue après transfert de l'ADNc codant pour l'intégrine $\beta 4$ et le collagène XVII respectivement [8, 9].

Par la suite, des kératinocytes non immortalisés d'un patient H-EBJ, porteurs d'une mutation homozygote abolissant la synthèse de la chaîne $\beta 3$ de la laminine-5, ont été transduits à l'aide d'un vecteur rétroviral exprimant une chaîne $\beta 3$ sauvage recombinante. Différents critères ont permis de conclure à une inversion

phénotypique complète de ces cellules: augmentation de l'adhérence kératinocytaire, diminution de la migration cellulaire, reconstitution complète des SAC (*stable anchoring contacts*, les équivalents des hémidesmosomes *in vitro*) sur plastique et d'hémidesmosomes sur derme mort [10] (figure 2). De manière intéressante, l'analyse de clones de cellules ayant un phénotype corrigé a permis de vérifier l'introduction des gènes fonctionnels et correcteurs dans des cellules « souches », qui permettent le renouvellement de la peau. En effet, certains clones transduits, possédant un pouvoir clonogénique – défini comme la capacité de cellules isolées à former des colonies – d'environ 100 % et une capacité à se multiplier pendant au moins 140 générations, sans altération de l'expression de la laminine-5 recombinante [11], présentent les caractéristiques de clones de cellules souches, ou holoclones [12]. Comme précédemment, ces cellules souches transduites sont dotées de bonnes capacités d'adhérence et sont capables de former des SAC *in vitro* et des hémidesmosomes sur derme mort. De plus, l'utilisation d'une nouvelle génération de vecteurs rétroviraux et l'établissement de nouvelles lignées cellulaires productrices virales dotées de titres infectieux très élevés [13]. L'introduction de gènes de sélection dans les cellules cibles devient ainsi superflue car celles-ci sont transduites avec des efficacités proches de 100 %.

Récemment, l'équipe de PA. Khavari a transduit l'ADNc codant pour le collagène XVII dans des kératinocytes de patients EBJ de type non H présentant un défaut d'expression de cette protéine [14]. En présence de trypsine, les cellules dont le phénotype est ainsi corrigé adhèrent plus fortement que les cellules de patients et forment un épithélium adhérent après greffe sur souris athymiques, confirmant la possibilité d'utiliser cette méthode dans le cas de formes légères d'EBJ.

Dans le cas des EB dystrophiques, pour lesquelles le niveau de clivage se situe dans la partie supérieure du derme, toutes les mutations identifiées touchent le gène codant pour le collagène VII. La correction du phé-

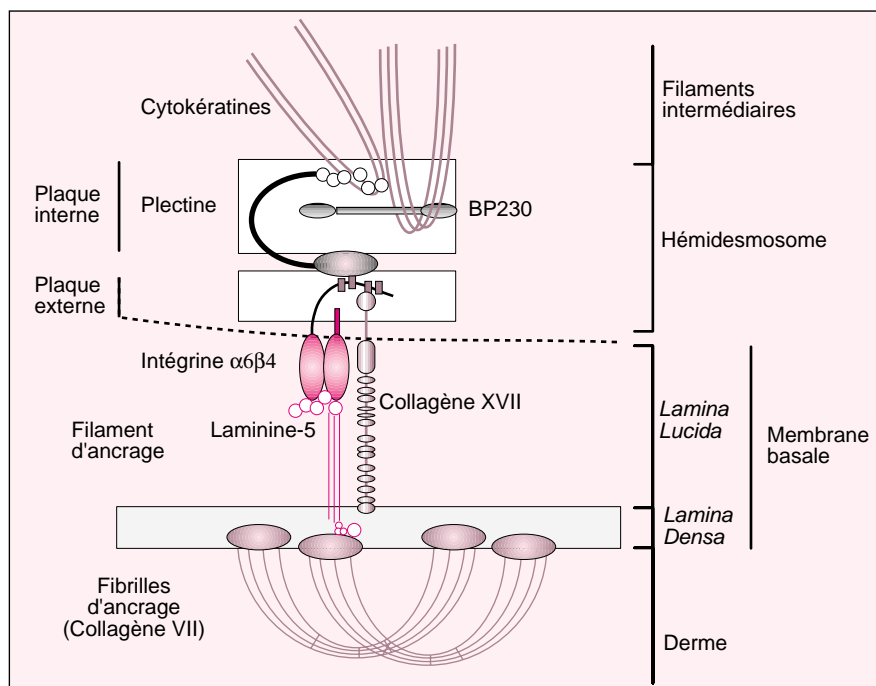


Figure 1. **Représentation schématique d'un hémidesmosome et de ses composants.** L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ permet d'établir le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette de kératines par l'intermédiaire du domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$ qui interagit avec le collagène XVII et avec la plectine. Elle est également reliée à différentes voies de signalisation, notamment à celle des MAPKinases et des kinases de stress. La sous-unité $\alpha 6$ interagit avec le collagène XVII par son domaine extracellulaire. Dans la peau, le ligand principal de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est la laminine-5.

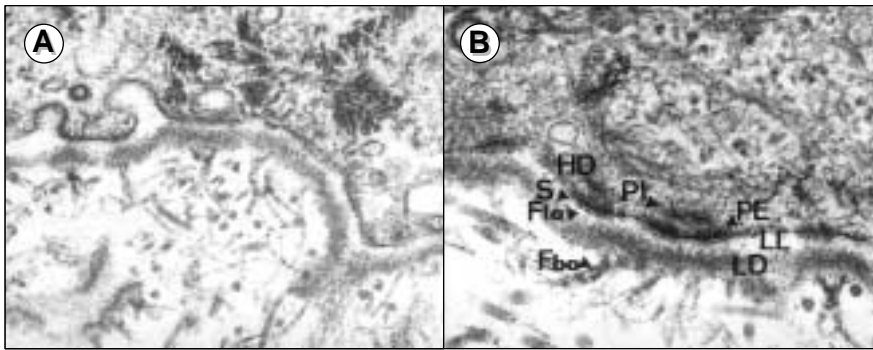


Figure 2. **Examen ultrastructural de la jonction dermo-épidermique d'épidermes artificiels reconstitués à partir de kératinocytes parentaux H-EBJ $\beta 3$ (A), et de kératinocytes H-EBJ transduits avec l'ADNc codant pour la chaîne $\beta 3$ sauvage (B).** Les cellules transduites assemblent des hémidesmosomes complets (HD) présentant une plaque interne (PI), une plaque externe (PE), des filaments d'ancrage (Fla) et une plaque dense sub-basale (S) dans la lamina lucida (LL). Les fibrilles d'ancrage (Fba) du derme arrivant dans la lamina densa (LD) sont également visibles. Au contraire, dans les kératinocytes basaux parentaux, les hémidesmosomes sont très rudimentaires et dépourvus de plaque d'ancrage, de plaque dense sub-basale et de filaments d'ancrage.

notype concernant les formes récessives les plus sévères de la pathologie est rendue difficile par la taille élevée (9 Kb) de l'ADNc correspondant. En effet, les vecteurs rétroviraux présentent des contraintes importantes de taille, et à l'heure actuelle, ils ne peuvent véhiculer efficacement que des ADNc d'une taille maximale de 5-6 Kb. Le transfert de copies complètes de cet ADNc a néanmoins été effectué avec succès dans des kératinocytes de rongeurs [15], mais les études fonctionnelles complémentaires n'ont pas été réalisées. Par ailleurs, un minigène de collagène VII (2kb) a pu être transféré dans des kératinocytes de patients atteints d'une EB dystrophique, et restaurer l'adhérence cellulaire [16].

Les ichtyoses récessives constituent une famille hétérogène de pathologies caractérisées par une cornification épidermique anormale, et dont les bases moléculaires ont été récemment élucidées. Celles-ci impliquent des enzymes ou des protéines structurales engagées dans la maturation de l'épiderme ou la formation de la barrière cutanée. Les ichtyoses lamellaires et les ichtyoses liées au chromosome X constituent les deux grandes catégories d'ichtyoses récessives.

L'ichtyose lamellaire est une pathologie sévère pouvant entraîner le décès

des enfants atteints à la suite de complications (septicémies ou perte de protéines ou d'électrolytes). Elle a été associée à des mutations dans le gène TGM1, qui code pour une transglutaminase (Tgase1) activant la formation de l'enveloppe cornifiée qui entoure les kératinocytes différenciés [17]. Des kératinocytes de patients n'exprimant pas la Tgase1 ont été transduits par des constructions rétrovirales porteuses de la forme sauvage de l'enzyme, puis greffés sur des souris immuno-déficientes [18]. L'épiderme ainsi reconstitué montre une expression restaurée de la Tgase 1 et une réversion phénotypique complète sur la base de critères cliniques, histologiques et fonctionnels. Cependant, la limite de cette expérience réside dans la durée d'expression du transgène, qui n'a pu dépasser un mois.

L'ichtyose liée au chromosome X, généralement moins sévère que l'ichtyose lamellaire, est caractérisée par une hypertrophie épidermique et un défaut de desquamation imputable au défaut d'expression de l'arylsulfatase C [19]. La transfection de l'ADNc sauvage correspondant a permis de mettre en évidence une amélioration de la maturation cellulaire et une correction partielle du phénotype des kératinocytes de patients. Plus récemment, une cor-

rection du phénotype pathologique de kératinocytes de patients, évalué en termes d'architecture tissulaire, d'apparence clinique et de fonctionnalité, a été observée après transfert rétroviral et greffe chez des souris [20]. En effet, les kératinocytes transduits reconstituent un épithélium complet après greffe sur souris athymiques, possédant les mêmes caractéristiques que les épithéliums issus de donneurs sains. Dans ce cas encore, toutefois, l'expression du gène correcteur n'a pu être prolongée au-delà d'un mois.

Le *xeroderma pigmentosum* est caractérisé par une photosensibilité extrême provoquant l'apparition de néoplasies cutanées sous forme de carcinomes basocellulaires, de carcinomes spinocellulaires ou de mélanomes. Cette photosensibilité s'explique par des anomalies des mécanismes de réparation de l'ADN après exposition aux rayonnements ultraviolets. En effet, les travaux portant sur l'identification des gènes impliqués dans les différents groupes de complémentarité de *xeroderma pigmentosum* ont donc permis d'associer cette pathologie à des défauts dans les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Des expériences de complémentarité par fusion cellulaire ont permis d'identifier 7 groupes génétiques (XP-A à XP-G) associés à la forme classique de *xeroderma pigmentosum* et à un variant [21]. L'identification de ces gènes a permis la réalisation d'expériences de transfert d'ADNc visant à corriger ces défauts. L'expression des gènes correspondants a ainsi été restaurée dans des fibroblastes déficients pour les fonctions XP-A, XP-B, XP-C et XP-D, permettant aux cellules transduites de recouvrer des capacités normales de réparation de l'ADN et de survie cellulaire après exposition aux rayonnements ultraviolets [22]. L'expression des gènes sauvages de réparation de l'ADN permet la correction d'autres anomalies fonctionnelles induites par les rayonnements UV, comme l'activité catalase, la régulation du facteur ICAM-1 ou la stabilité de la protéine p53. La correction du système de réparation de l'ADN est donc suffisante pour enrayer les altérations métaboliques qui accélèrent la progression tumorale.

Autres applications du transfert de gènes dans la peau

Les applications de la thérapie génique cutanée trouvent leur prolongement dans bien d'autres cas que celui des génodermatoses, tels que le traitement des troubles de la cicatrisation, le traitement des désordres systémiques, l'immunomodulation cutanée, la thérapie des cancers de la peau.

Les méthodes qui visent à accélérer la cicatrisation utilisent le plus souvent le transfert de gènes codant pour des facteurs de croissance ou des cytokines. Ainsi, le transfert et l'expression exogène d'un facteur de croissance épidermique (hEGF) accroît de 20 % la vitesse de cicatrisation chez le porc [23]. En outre, l'application d'aFGF (*acidic fibroblast growth factor*) ou le transfert d'un plasmide d'expression pour cette protéine dans la peau permet d'accélérer la cicatrisation et d'augmenter la force de rupture cicatricielle chez la souris [24]. Par ailleurs, la surexpression de PDGF-B après infection par un vecteur adénoviral corrige les défauts de cicatrisation ischémiques chez le lapin [25].

Dans une autre optique, les kératinocytes peuvent être utilisés comme vecteurs de sécrétion d'une protéine d'intérêt clinique, telles que l'hormone de croissance humaine, l'apolipoprotéine E, le facteur IX de coagulation ou l'interleukine 10 [26-28], protéines habituellement synthétisées par d'autres tissus. On peut également induire l'expression d'une enzyme impliquée dans la dégradation de substrats toxiques, telle que l'ornithine-delta-aminotransférase [29]. Par ailleurs, l'expression d'une préproenkephaline *via* une infection cutanée par un vecteur de type herpès a pour conséquence des effets analgésiques sur la souris [30].

Le micro-environnement cutané contient de nombreuses cellules présentatrices d'antigènes et des cellules susceptibles de produire diverses cytokines stimulatrices de la réponse immunitaire. Des expériences préliminaires ont donc visé à développer les techniques d'immunisation génétique à partir de la peau. Ainsi, un plasmide exprimant la glycoprotéine gp63 de *Leishmania* a été injecté dans

la peau de souris, induisant une protection des souris contre la leishmaniose [31]. En outre, l'application d'ADN nu en solution contenant un plasmide codant pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HbaAg) induit une réponse immunitaire cellulaire et humorale comparable à celle obtenue par injection intramusculaire de polypeptides vaccinaux commercialisés [32].

L'introduction de transgènes dans la peau dans le but d'enrayer la progression tumorale a également été tentée, soulevant des espoirs mais montrant aussi ses limites. Ce sujet nécessiterait un article à lui seul, et ne sera pas développé ici. Globalement, parmi les approches choisies, citons pour mémoire le transfert de séquences « suicide » de type thymidine-kinase de l'herpès simplex [33], le transfert de la protéine p53 [34], l'expression de cytokines (interleukine 2, 12...) [35-37]. Bon nombre d'essais de vaccination anti-tumorale ont été réalisés avec des cellules de mélanome, qui sont parmi les tumeurs les plus immunogènes [38]. Le traitement de patients à l'aide de cellules de mélanomes modifiées par introduction de gènes de cytokines a également constitué le support de divers protocoles expérimentaux [39]. Dans tous les cas, la durée d'expression des transgènes et l'efficacité du transfert de gènes ont constitué des écueils qui n'ont pu être surmontés.

Perspectives

Bien des efforts sont encore nécessaires pour que la thérapie génique cutanée soit utilisable cliniquement en routine. Les mécanismes d'adhérence, de croissance et de différenciation des kératinocytes sont étroitement régulés par l'expression séquentielle de différents gènes, s'exprimant de la couche basale aux couches épidermiques supérieures. Il semble donc qu'une correction génétique appropriée implique le ciblage de l'ADNc exogène au niveau d'une couche spécifique, ce qui requiert une régulation contrôlée du transgène, qui demeure pour le moment hors de portée. Cependant, l'expression ciblée des transgènes n'est pas toujours indispensable, notamment dans le cas de l'ichtyose ou de l'EB,

comme le montrent les études de Choate [18], Vailly [10] et Seitz [14]. En effet, dans les ichtyoses, la quantité de substrats – faible dans les cellules basales et forte dans les cellules supra-basales – module l'activité de la sulfatase stéroïde et de la Tgase 1. Dans le cas des EB, l'expression contrôlée des deux chaînes endogènes de laminine-5 ou de facteurs spécifiques permettant la polymérisation du collagène VII induit une expression focalisée des molécules curatives.

Un autre défi majeur concerne la durée d'expression des transgènes, qui se révèle souvent longue *in vitro*, mais courte *in vivo*. De manière intéressante, il a été montré que la transduction de kératinocytes souches par une construction rétrovirale exprimant l'enzyme β -galactosidase permet une expression de la protéine recombinante pendant au moins 40 semaines après greffe chez des souris athymiques [40]. Il est à noter que durant cette longue période, aucune inactivation du transgène n'a été observée, contrairement aux prédictions fondées sur l'hypothèse de l'extinction des promoteurs viraux. D'une manière générale, il semblerait donc que la nature des cellules transduites jouerait un rôle prépondérant dans la durée d'expression des transgènes. Cette observation renforce encore l'intérêt de la réversion phénotypique de cellules souches d'EBJ.

Le transfert direct de gènes chez l'animal *in vivo* a été tenté, mais jusqu'à récemment, les techniques employées ne permettaient pas de transduire des cellules souches, et induisaient des durées d'expression des transgènes insuffisantes. Le ciblage des cellules souches *in vivo* constitue donc un enjeu essentiel pour l'avenir. Cette approche est illustrée par un travail récent montrant que le transfert rétroviral d'un transgène (codant l'enzyme β -galactosidase) dans un épiderme *in vivo* est possible, mais seulement après abrasion de la peau. L'expression du transgène est maintenue pendant 16 semaines dans des kératinocytes souches folliculaires ou interfolliculaires chez des souris immunodéficientes ou exprimant la β -galactosidase de manière constitutive [41]. Néanmoins l'efficacité de transduc-

tion *in vivo* reste encore insuffisante. Pour cette raison, de nouveaux vecteurs dérivés du virus AAV (*adenovirus associated virus*) et des lentivirus sont en cours de développement. En effet, ils présentent l'avantage d'infecter efficacement les cellules prolifératives et non prolifératives (dont font partie les cellules souches) et d'être non pathogènes, ce qui permet d'envisager à terme un transfert *in vivo* direct et sûr.

Un aspect important concernant la stabilité du transgène repose sur la réaction immunitaire de l'hôte contre le peptide recombinant, car celui-ci contient le plus souvent des épitopes qui lui sont inconnus et qui peuvent induire un rejet. Cette restriction concerne les expériences menées aussi bien *ex vivo* qu'*in vivo* (Tableau II). Des études complémentaires seront nécessaires pour contourner cet inconvénient, notamment par l'intermédiaire de l'utilisation de modèles animaux plus appropriés que les souris immunodéficientes. L'identification récente de lignées de chiens porteurs de formes héréditaires d'EB permettra vraisemblablement d'évaluer, pour ces maladies, les effets thérapeutiques du transfert de gène avant la réalisation d'essais cliniques humains. Enfin, l'efficacité des techniques de « transfert physique » de l'ADN nu reste actuellement encore très faible puisque le nombre de cellules atteintes, *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, est très bas. Pour le moment, ces procédés de transfert sont donc plus adaptés aux études fondamentales concernant l'expression génique qu'à des théra-

pies de pathologies héréditaires. Cependant, ce sont les techniques de transfert non virales, encore balbutiantes, qui pourront sans doute un jour apporter des solutions pour le transfert d'ADNc dans la peau en permettant de traiter des zones étendues de tissu. Ainsi, les progrès de la vectorologie contribueront largement au passage de l'étape d'investigation à celle de l'application clinique ■

RÉFÉRENCES

1. Peschanski M. Thérapie génique: du rêve à la (dure) réalité scientifique. *Med Sci* 1999; 15: 591-3.
2. Meneguzzi G, Aberdam D, Vailly J, Ortonne JP. Vers la compréhension moléculaire des épidermolyses bulleuses héréditaires. *Med Sci* 1993; 9: 387-95.
3. Ortonne JP, Meneguzzi G. Implication de la plectine dans les maladies du cytosquelette. *Med Sci* 1997; 13: 1220-4.
4. Aberdam D, Galliano MF, Vailly J, et al. Herlitz's junctional epidermolysis bullosa is genetically linked to mutations in the nicein/kalinin (laminin-5) LAMC2 gene. *Nat Genet* 1994; 6: 299-304.
5. Vidal F, Aberdam D, Miquel C, et al. Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Nat Genet* 1995; 10: 229-34.
6. Chavanas S, Gache Y, Tadini G, et al. A homozygous in-frame deletion in the collagenous domain of bullous pemphigoid antigen BP180 (type XVII collagen) causes generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 74-8.
7. Gagnoux-Palacios L, Vailly J, Durand-Clement M, Wagner E, Ortonne J-P, Meneguzzi G. Functional re-expression of laminin-5 in laminin- γ 2 deficient human keratinocytes modifies cell morphology, motility, and adhesion. *J Biol Chem* 1996; 271: 18437-44.

8. Gagnoux-Palacios L, Gache Y, Ortonne JP, Meneguzzi G. Hemidesmosome assembly assessed by expression of a wild type integrin β 4 cDNA in junctional epidermolysis bullosa keratinocytes. *Lab Invest* 1997; 77: 1-10.

9. Borradori L, Chavanas S, Schaapveld RQJ, et al. Role of the bullous pemphigoid antigen 180 (BP180) in the assembly of the hemidesmosomes and cell adhesion. Reexpression of the BP180 in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa keratinocytes. *Cell Res* 1998; 239: 463-76.

10. Vailly J, Gagnoux-Palacios L, Dell'Ambra E, et al. Corrective gene transfer of keratinocytes from patients with junctional epidermolysis bullosa restores assembly of hemidesmosomes in reconstructed epithelia. *Gene Ther* 1998; 5: 1322-32.

11. Dellambra E, Vailly J, Pellegrini G, et al. Corrective transduction of human epidermal stem cells in laminin-5 dependent junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1359-70.

12. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2302-06.

13. Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MKL. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* 1995; 74: 30-6.

14. Seitz CS, Giudice GJ, Balding SD, Marinkovich MP, Khavari PA. BP180 gene delivery in junctional epidermolysis bullosa. *Gene Ther* 1999; 6: 42-7.

15. Sawamura D, Meng X, Itai K, et al. *In vitro* and *in vivo* expression of full-length cDNA of type VII collagen: possibility of gene therapy for dystrophic epidermolysis bullosa (DEB). *J Invest Dermatol* 1999; 112: 551.

16. Chen M, O'Toole EA, Liu YY, Kasahara N. Corrective gene transfer in dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 552.

17. Huber M, Rettler I, Bernasconi K, et al. Mutation of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* 1995; 267: 525-8.

18. Choate KA, Kinsella TM, Williams ML, Nolan GP, Khavari PA. Transglutaminase I delivery to lamellar ichthyosis keratinocytes. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 2247-53.

19. Yen PH, Allen E, Marsh B, et al. Cloning and expression of steroid sulfatase cDNA and the frequent occurrence of deletion in STS deficiency: implication for X-Y interchange. *Cell* 1987; 49: 443-54.

20. Freiberg R, Choate K, Deng H, Alperin E, Shapiro L, Khavari P. A model of corrective gene transfer in X-linked ichthyosis. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 927-33.

21. Cleaver J, Thompson L, Richardson A, States J. A summary of mutations in the UV-sensitive disorders: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy. *Hum Mutat* 1999; 14: 9-22.

Tableau II
SITUATION ACTUELLE CONCERNANT LES ÉTUDES DE THÉRAPIE GÉNÉRIQUE DES MALADIES HÉRÉDITAIRES TOUCHANT LES KÉRATINOCYTES

Caractérisation physiopathologique des génodermatoses	bonne
Identification des gènes candidats	bonne
Modèles animaux	moyenne/bonne
Tranfert génétique <i>ex vivo</i>	bonne
Tranfert génétique <i>in vivo</i>	mauvaise/moyenne
Greffe	mauvaise/bonne
Expression à long terme <i>ex vivo</i>	bonne
Expression à long terme <i>in vivo</i>	bonne
Réponse immunitaire de l'hôte	à explorer

RÉFÉRENCES

22. Zeng L, Quilliet X, Chevallier-Lagente O, Eveno E, Sarasin A, Mezzina M. Retrovirus-mediated gene transfer corrects DNA repair defect of xeroderma pigmentosum cells of complementation groups A, B and C. *Gene Ther* 1997; 4: 1077-84.
23. Andree C, Swain WF, Page CP, Macklin MD, Slama J, Hatzis D. *In vivo* transfer and expression of a human epidermal growth factor gene accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12188-92.
23. Sun L, Xu L, Chang H, *et al.* Transfection with aFGF cDNA improves wound healing. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 313-8.
25. Liechty KW, Nesbit M, Herlyn M, Radu A, Adzick NS, Crombleholme TM. Adenoviral-mediated overexpression of platelet-derived growth factor-B corrects ischemic impaired wound healing. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 375-83.
26. Fenjves ES, Gordon DA, Pershing LK, Williamson DL, Taichman LB. Systemic distribution of apolipoprotein E secreted by grafts of epidermal keratinocytes: implications for epidermal function and gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8803-7.
27. Gerrard AJ, Hudson DL, Brownlee GG, Watt FM. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. *Nat Genet* 1993; 3: 180-3.
28. Meng X, Sawamura D, Tamai K, Hanada K, Ishida H, Hashimoto I. Keratinocyte gene therapy for systemic diseases. *J Clin Invest* 1998; 101: 1462-7.
29. Sullivan DM, Jensen TG, Taichman LB, Csaky KG. Ornithine-d-aminotransferase expression and ornithine metabolism in cultured epidermal keratinocytes: towards metabolic sink therapy for gyrate atrophy. *Gene Ther* 1997; 4: 1036-44.
30. Wilson S, Yeoman DC, Bender MA, Lu Y, Goins WF, Glorioso JC. Antihyperalgesic effects of infection with a preproenkephalin-encoding herpes virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3211-6.
31. Vogel JC. A direct *in vivo* approach for skin gene therapy. *Proc Assoc Am Phys* 1999; 111: 190-7.
32. Fan H, Lin Q, Morrisey GR, Khavari PA. Immunization *via* hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 870-2.
33. O'Malley BW, Chen SH, Schwartz MR, Woo SLC. Adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer in a nude mouse model. *Cancer Res* 1995; 55: 1080-5.
34. Liu TJ, El Nagger AK, McDonnell TJ, *et al.* Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1995; 55: 3117-22.
35. Stewart AK, Lassam NJ, Quirt IC, *et al.* Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a phase 1 clinical trial. *Gene Ther* 1999; 6: 350-63.
36. Oshikawa K, Shi F, Rakhmilevich AL, Sondel PM, Mahvi DM, Yang NS. Synergistic inhibition of tumor growth in a murine mammary adenocarcinoma model by combinational gene therapy using IL-12, pro-IL-18, and IL-1 β converting enzyme cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13351-6.
37. Sobol RE, Shawler DL, Carson C, *et al.* Interleukin 2 gene therapy of colorectal carcinoma with autologous irradiated tumor cells and genetically engineered fibroblasts: a Phase I study. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2359-65.
38. McMasters KM, Sondak VK, Lotze MT, Ross MI. Recent advances in melanoma staging and therapy. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 467-75.
39. Hennge UR, Taichman LB, Kaur P, *et al.* How realistic is cutaneous gene therapy? *Exp Dermatol* 1999; 8: 419-31.
40. Kolodka TM, Garlick JA, Taichman LB. Evidence for keratinocyte stem cells *in vitro*: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4356-61.
41. Ghazizadeh S, Harrington R, Taichman LB. *In vivo* transduction of mouse epidermis with recombinant retroviral vectors: implication for cutaneous gene therapy. *Gene Ther* 1999; 6: 1267-75.
42. Meneguzzi G, Vailly J. Gene therapy of inherited skin disease. In: Volc-Platzer B and Hengge UR ed. *Gene Therapy in Dermatology*. Berlin, Springer Verlag 2000; sous presse.

Summary

Cutaneous gene therapy: overview and perspectives

Progress in gene therapy is currently limited by the technical challenges of efficient gene transfer and long term expression of the curative transgene. Nevertheless, gene therapy constitutes a promising field in medical research. Skin is a good target for gene therapy and several trials of corrective gene transfer have been successfully performed *in vitro*. In this review, we report the recent progress in phenotypic reversion of cultured cells obtained from patients suffering from epidermolysis bullosa, recessive ichthyosis or xeroderma pigmentosum. The techniques of cutaneous gene therapy can be applied to wound healing, treatment of systemic disorders, cutaneous immunomodulation and skin cancers. Successful development of the different approaches relies on the improvement of safe and efficient methods for gene transfer and on the establishment of appropriate animal models.

TIRÉS À PART

G. Meneguzzi.