

Paul-Henry Schmelck  
Pierre Chatelain  
Raphaël Rappaport  
Paul Czernichow  
Raja Brauner

## **Nouvelles voies thérapeutiques en endocrinologie pédiatrique**

*L'endocrinologie pédiatrique post-natale a largement profité ces dernières années des progrès en biologie fondamentale, tels que la découverte de nouveaux neuropeptides, le développement de leurs analogues structuraux, ainsi que la rapide exploitation du génie génétique. Ces progrès ont été acquis grâce à une coordination nationale et internationale des équipes médicales spécialisées. Ils ont permis d'avancer dans les traitements de maladies comme le déficit en hormone de croissance, le diabète insipide par défaut de vasopressine et la puberté précoce d'origine centrale.*

### **Les déficits en hormone de croissance**

I. La production d'hormone de croissance humaine par génie génétique.

L'hormone de croissance humaine est une protéine de poids moléculaire 22 000, constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 191 acides aminés et possédant 2 ponts disulfure. Dans l'hypophyse, la protéine est issue d'un précurseur de 217 acides aminés contenant un peptide signal de 26 AA qui est éliminé lors du processus de sécrétion. Les enfants insuffisants hypophysaires sont actuellement traités de façon efficace avec un extrait d'hypophyses humaines, hautement purifié et contenant surtout l'hormone dite 22 K. Afin de disposer de grandes quantités d'hormone, on a fait appel aux techniques du génie génétique. En utilisant une bactérie (*E. coli*) comme cellule hôte, la méthode a souvent consisté à faire exprimer le gène de la protéine désirée, après avoir remplacé la séquence codant le peptide signal par un simple codon d'initiation AUG.

Ceci aboutit à l'accumulation dans le cytoplasme de la bactérie d'une protéine possédant une méthionine

supplémentaire en position N-terminale, ou hormone de croissance met-hGH.

L'accumulation cytoplasmique d'une protéine en grande quantité entraîne souvent l'aggrégation de celle-ci sous forme insoluble, relativement protégée des dégradations protéolytiques et facilement séparable des protéines solubles. Cependant, sa solubilisation peut entraîner des modifications de conformation irréversibles; et lorsque la reconstitution de ponts disulfure s'avère nécessaire, celle-ci peut s'effectuer de manière défectueuse. Enfin, la présence d'une méthionine supplémentaire pourrait être à l'origine de la formation d'anticorps, après administration à l'homme.

Les premiers laboratoires pharmaceutiques ayant utilisé la voie classique d'expression du gène ont ainsi obtenu une Met-hGH [1]. La protéine a été purifiée et caractérisée par électrophorèse sur gel, chromatographie de perméation, électroforesis, analyse de séquence N-terminale, et analyse de fragments obtenus par digestion enzymatique et séparés sur HPLC. L'activité biologique de la Met-hGH, testée par le Tibia test et la croissance pondérale chez le rat hypophysectomisé, s'est montrée identique à celle de l'hormone humaine extractive. De même, l'activité métabolique chez l'homme de ces deux hormones a été comparable sur l'élévation des taux plasmatiques de somatomédine C et de tri-

glycérides et sur la diminution de ceux de l'urée et du cholestérol. Cependant, même très purifiée, la préparation injectable utilisée reste encore immunogène chez quelques-uns des enfants traités.

Afin de pallier cet inconvénient, d'autres voies de biosynthèse ont été recherchées avec l'idée de reproduire le mécanisme moléculaire de sécrétion des protéines [2]. Il existe en effet dans les processus de sécrétion, des éléments communs entre les procaryotes et les eucaryotes. Le signal peptidase bactérienne peut correctement hydrolyser la préprotéine eucaryote sécrétée dans le périplasma bactérien; elle reste sous forme soluble et il est possible de la purifier après un simple choc osmotique. Un système d'expression efficace et d'un niveau rentable a été mis au point en utilisant un promoteur fort, des sites de liaisons aux ribosomes modifiés, une souche hôte *E. coli* bien choisie, ainsi que des conditions de culture optimisées [3].

Différents fractionnements ont confirmé que l'hormone de croissance était présente dans l'espace périplasmique de la bactérie. Un traitement doux par choc osmotique, sans lyse bactérienne, permet de récupérer plus de 80 % de l'hGH détectée dans la bactérie sous forme soluble. Les procédés de purification à une large échelle aboutissent à un matériel purifié à homogénéité (gel de SDS-polyacrylamide, électrofocalisation, filtration sur gel, HPLC). La composition en acides aminés est en accord avec la composition théorique déduite de la séquence protéique. La séquence en acides aminés analysés par dégradation d'Edman montre que l'acide aminé en position 1 correspond à la phénylalanine. Ceci confirme que la maturation de la préprotéine pendant la translocation vers l'espace périplasmique s'est effectuée dans de bonnes conditions, comparables à celles de l'hypophyse. D'autres expériences de caractérisation confirment l'identité de cette hGH biosynthétique à l'hGH extractive : composition en acides aminés et séquence de chaque peptide obtenu après digestion enzymatique et séparation sur HPLC; vérification

de la bonne position des ponts disulfure. Enfin, la spectroscopie UV, l'affinité vis-à-vis d'anticorps polyclonaux et monoclonaux, et surtout l'activité biologique chez le rat hypophysectomisé (gain de poids) ne révèlent aucune différence entre ces deux hormones. On peut en conclure qu'il est maintenant possible d'utiliser les techniques du génie génétique pour la production de protéines identiques à celles obtenues par extraction pour usage thérapeutique.

Il reste à démontrer l'efficacité et la bonne tolérance de ce produit dans des essais cliniques chez l'enfant atteint de déficit somatotrope.

**Paul-Henry Schmelck**

Directeur scientifique, *Elf-Bio-Recherches*. Groupe *Elf-Sanofi*.  
Labège-Innopole. B.P. 137,  
31328 Castanet-Tolosan.

## RÉFÉRENCES

- Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, *et al.* Direct expression in *Escherichia Coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 1979; 281 : 544-8.
- Roskam W, Rougeon F. Molecular cloning and nucleotide sequence of the human growth hormone structural gene. *Nucleic Acids Res* 1979; 7 (2) : 305-20.
- Schmelck PH, Roskam W, Roncucci R. L'hormone de croissance humaine : production industrielle en vue. *La Recherche* 1984; 152 : 257-9.
- Guillemin R, Brazeau P, Bolhen P, Esch F, Ling N, Werhenberg WB. Growth Hormone-Releasing Factor from a human pancreatic tumor caused acromegaly. *Science* 1982; 218 : 585-7.
- Rivier J, Spiess J, Thorner MO, Vale W. Characterization of a Growth Hormone-Releasing factor from a human pancreatic tumor. *Nature* 1982; 300 : 276-8.
- European collaborative study on the effect of synthetic 1-44 Growth Hormone-Releasing Factor (GRF) on plasma Growth Hormone (GH) in prepubertal children with growth failure. *Pediatr Res* 1985; 19 : 610 (Abstract).
- Thorner MO, Reschke J, Chitwood J, *et al.* Acceleration of growth in two children treated with human growth hormone releasing factor. *N Engl J. Med* 1985; 312 : 4-9.
- Thorner MO, Reschke J, Chitwood J, *et al.* Development of antibody to growth hormone-releasing factor. *N Engl J Med* 1985; 312 : 994.

## II. Le GRF, voie thérapeutique nouvelle?

Moins de 3 années après sa découverte par les groupes de R. Guillemin [4] et W. Vale [5], la somatotrope ou « *growth hormone-releasing factor* » entre activement dans la phase des essais thérapeutiques. L'espoir est grand mais les problèmes posés restent nombreux et de taille. Largement prépondérante dans l'hypothalamus humain, la molécule naturelle est le (1-44) GRF-NH<sub>2</sub>, mais on trouve également le (1-40) GRF-NH<sub>2</sub>. Si la séquence 1-29 semble posséder l'activité biologique nécessaire (en tant que sécrétagogue de la somathormone GH) et présente l'intérêt d'une plus grande facilité de production, la prudence incite cependant à préférer le produit naturel, le (1-44) GRF-NH<sub>2</sub>. Le GRF produit par synthèse chimique a fait preuve de ses qualités de pureté et stabilité. Sa tolérance après injection unique intraveineuse est excellente, comme vient de l'établir une large étude multicentrique européenne, à l'instigation de *Sanofi - Recherche* [6]. En l'état actuel de nos connaissances, le seul candidat au traitement est l'enfant présentant un retard de croissance, lié à un déficit somato-

trope et ayant fait la preuve d'une augmentation « confortable » de GH plasmatique, après l'injection de GRF. La « sélection », ou plus exactement la reconnaissance du bon candidat au traitement par le GRF illustre la première difficulté et non la moindre. L'essai multicentrique européen démontre que parmi les déficits somatotropes idiopathiques sévères n'ayant jamais été traités par la GH, 77 % des enfants ont une amplitude de réponse dépassant largement les tests traditionnels, faisant de la majorité de ces patients des candidats au traitement par le GRF. Expérimentalement, il semble que les injections répétées de GRF peuvent même induire une augmentation de la réponse de GH, comme on l'avait déjà observé avec la LHRH dans le traitement de l'insuffisance gonadotrope.

Que dire du phénomène de « désensibilisation » ? Si pour la LHRH, la preuve n'est plus à faire de son existence, pour le GRF les arguments divergent. Chez le rat, l'administration pulsatile du GRF n'entraîne pas de diminution de la réponse de GH plasmatique, alors que la perfusion continue de GRF s'accompagne d'une diminution progressive de la GH plasmatique. Or W. Vale rapporte, qu'inversement, les souris GRF-transgéniques exprimant le gène du GRF, sont en moyenne 25 % plus grandes et grosses que les souris témoins, sans preuve de pulsatilité de la sécrétion et en présence de taux considérables de GRF. Il semble donc que le phénomène de diminution de la réponse de GH au GRF ne s'observe pas dans certaines conditions, soit en présence de taux très élevés de GRF, soit de pulsatilité. La stratégie thérapeutique ultérieure devra s'en inspirer.

La voie d'administration nasale qui serait idéale, n'est pas actuellement opérationnelle. Les formes retard sont séduisantes... sous réserve de leur tolérance locale et de la persistance de l'effet sécrétagogue de la GH. Le GRF semi-retard, d'une durée d'action de 8 à 12 heures, possède de sérieux atouts, car la perfusion nocturne continue de GRF augmente la quantité totale intégrée de GH sécrétée. Si cette notion est

confirmée sur une plus grande échelle, l'utilisation d'un GRF semi-retard, administré en sous-cutané risque fort de s'imposer. La preuve vient en effet d'être apportée que les injections sous-cutanées pluri-quotidiennes (à la pompe) de GRF<sub>1-40</sub> peuvent induire une accélération de la croissance staturale dans le déficit somatotrope idiopathique [7]. Lorsque des quantités suffisantes de GRF seront disponibles, la fréquence des injections thérapeutiques pourra augmenter afin de reproduire le rythme de la sécrétion physiologique, diurne et nocturne. Déjà disponibles, les pompes, de plus en plus miniaturisées et maniables, peuvent apporter un précieux complément aux possibilités thérapeutiques. L'utilisation du GRF non modifié, en injections sous-cutanées répétées (éventuellement à la pompe), débutera sous forme d'un essai thérapeutique dans une large étude multicentrique, chez l'insuffisant hypophysaire.

#### **Pierre Chatelain**

*Chargé de Recherche, Inserm  
U. 34. Hôpital Debrousse. 29, rue  
Sœur-Bouvier. 69322 Lyon.*

### **III. Commentaires**

Alors que le traitement par l'hormone de croissance extraite d'hypophyse humaine semblait bien établi, avec ses limites et ses difficultés mais aussi ses résultats très spectaculaires, trois événements sont venus bouleverser la situation présente. Deux cas d'encéphalite à virus lent de Creutzfeld-Jakob ont été observés chez des enfants qui avaient reçu la première préparation d'hGH extractive hautement impure. Dès lors, des enquêtes épidémiologiques ont été engagées à la recherche d'autres cas possibles dans les pays ayant centralisé l'usage de la hGH auprès des comités nationaux. Bien que la liaison ne soit pas facilement établie, il est hautement probable que des préparations extractives avaient pu être contaminées par un tissu autopsique infecté. Ces développements vont accélérer la production de cette même hormone par génie généti-

que. L'hormone dite méthionyl-hGH est en effet préparée depuis quelque temps et utilisée au stade d'étude clinique. Les premiers résultats sur la croissance sont excellents. Si les cliniciens ont d'abord été confrontés à des accidents d'intolérance, ceux-ci semblent avoir disparu avec les préparations récentes les plus purifiées : la surveillance porte sur la production d'anticorps dirigés contre les protéines d'origine bactérienne, restées présentes dans la préparation à usage clinique, et d'anticorps dirigés contre l'hormone de croissance elle-même. Il faudra plusieurs années pour apprécier la tolérance immunitaire de ces nouveaux produits et reconnaître leur innocuité. Enfin, nouveau venu parmi les peptides hypophysaires, le GRF est maintenant préparé par synthèse chimique et cherche sa place comme concurrent de la hGH. Il n'est pas possible de prédire celle-ci, mais les premiers résultats cliniques sont encourageants et la maniabilité de ce petit peptide pourrait être très améliorée par des modifications de sa pharmacocinétique. Sa spécificité d'action sur la cellule somatotrope est une qualité essentielle. Cette stimulation soutenue et prolongée de l'anté-hypophyse va peut être créer un comportement particulier de la cellule somatotrope qui reste à identifier. Sa tolérance immunitaire est sous surveillance [8]. A plus longue échéance, on peut imaginer l'utilisation clinique des facteurs de croissance tels que l'IGF<sub>1</sub>, dont les indications seraient complémentaires des précédentes : incapacité à produire les somatomédines, anticorps circulants contre hGH, états éventuels de « résistance » à la hGH et au GRF. Il reste encore une grande distance entre cette application clinique et des résultats expérimentaux aussi prometteurs que la stimulation de la croissance, obtenue par administration continue de IGF<sub>1</sub> au rat hypophysectomisé.

#### **Raphaël Rappaport**

*Directeur de l'Unité Inserm  
U. 30. Hôpital des Enfants-Malades. 149, rue de Sèvres. 75743  
Paris Cedex 15.*