

Thérapie génique : espoirs et limites⁽¹⁾

La thérapie génique est aujourd'hui à la mode car elle constitue une approche thérapeutique complètement nouvelle. Des développements considérables seront néanmoins nécessaires avant que l'on sache si une proportion significative des millions de malades atteints de maladies génétiques pourra bénéficier de tels traitements. L'utilisation thérapeutique de l'ADN a aussi de potentielles et larges indications dans des maladies acquises. Seule la thérapie génique somatique semble adaptée au traitement des malades : elle peut être pratiquée, selon les affections, par autogreffe de cellules modifiées *ex vivo* ou par administration *in vivo*, systémique ou locale, de vecteurs contenant l'ADN à transférer. Les vecteurs rétroviraux semblent les mieux appropriés au transfert *ex vivo* alors que les vecteurs adénoviraux semblent prometteurs pour l'administration *in vivo*.

Axel Kahn
Pascale Briand

ADRESSES

A. Kahn : directeur de recherches à l'INSERM, Institut Cochin de Génétique Moléculaire, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

P. Briand : directeur de recherches à l'Inserm, Institut Cochin de Génétique Moléculaire, 22, rue Méchain, 75014 Paris, France.

(1) Cet article a fait l'objet d'une présentation orale à la 4^e Journée Nationale d'Actualités en Immunologie, organisée par les Laboratoires Cassenne, à Paris, le 15 juin 1991.

La thérapie génique est à la mode. Les médias y consacrent de grands titres, les revues spécialisées de longues analyses, des congrès sont organisés pour en discuter ... et une nouvelle revue s'intitule *Human Gene Therapy*. Ce succès ... succès d'estime bien avant que d'être un succès tout court, tient à deux raisons, l'une objective et l'autre du domaine des fantasmes. Objectivement, la thérapie génique correspond au premier changement de statut de l'ADN qui, de potentiel responsable des maladies, devient potentiel médicamenteusement. Subjectivement, agir sur le gène, c'est agir sur l'essence même de l'être, ce programme impitoyable et immuable qui nous lie à nos ascendants aussi bien qu'à nos descendants et gouverne ce que nous

sommes, influant ainsi sur ce que nous faisons. En réalité, il vaudrait mieux ne voir ici qu'une nouvelle méthode de traitement, potentiellement intéressante mais à laquelle il reste à faire ses preuves et dont les indications éventuelles sont encore à préciser. Le point commun de toutes les techniques de thérapie génique est, comme cela est indiqué plus haut, l'utilisation thérapeutique de l'ADN, qu'il s'agisse d'apporter un nouveau gène pour pallier l'insuffisance qualitative ou quantitative d'un gène résident altéré, de moduler, en plus ou en moins, l'expression génique endogène, cellulaire ou éventuellement virale, ou encore de corriger exactement l'anomalie structurale d'un gène muté.

La thérapie génique peut ainsi s'envisager pour traiter aussi bien des mala-

dies héréditaires que des affections acquises. Ni pour l'une, ni évidemment pour l'autre, elle ne constitue l'unique approche thérapeutique.

Les traitements possibles des maladies génétiques

Les médecins disposent de plusieurs méthodes d'efficacité et d'applicabilité variables selon les cas pour tenter de traiter des maladies génétiques.

• **Contourner le blocage d'une voie métabolique**

Certaines maladies sont dues à l'impossibilité d'utiliser certains corps chimiques d'origine alimentaire. Il s'ensuit l'accumulation de substances toxiques qu'il est possible d'éviter en éliminant de l'alimentation les aliments incriminés. La phénylcétonurie, mais aussi l'intolérance au lactose et au fructose, sont des exemples de ce type d'affections.

• **Diminuer les conséquences d'une anomalie génétique**

Il est possible, sans modifier en rien les désordres engendrés par une maladie génétique, d'en diminuer les conséquences. L'hyper-fragilité génétique de la paroi des globules rouges de certains malades atteints, par exemple, de microsphérocytose constitutionnelle, entraîne ainsi une destruction prématurée de ces cellules à l'intérieur de la rate. Dans ces cas, la splénectomie réduit considérablement l'hémolyse, guérissant pratiquement ces patients. Une autre maladie du globule rouge, la drépanocytose, entraîne une diminution de la solubilité de l'hémoglobine qui, en précipitant, conduit à l'obstruction des petits vaisseaux. Différentes mesures ont pour but d'augmenter la solubilité de cette hémoglobine et de diminuer les risques d'obstruction vasculaire, voire de prévenir les surinfections en cas d'obstruction. La kinésithérapie pulmonaire chez les malades souffrant d'obstructions bronchiques à répétition du fait d'une mucoviscidose est à ranger dans la même catégorie de traitement.

• **Apporter la substance dont l'absence est à l'origine des symptômes**

Toutes les maladies génétiques connues sont dues, directement ou indi-

rectement, à l'absence ou aux anomalies fonctionnelles de protéines. La protéine normale peut être apportée au malade, comme cela se fait pour combattre les épisodes hémorragiques des hémophilies. Encore plus simple est le traitement des déficits héréditaires en hormones, par exemple les hypothyroïdies congénitales ou les nanismes héréditaires par absence d'hormone de croissance ; l'apport de l'hormone manquante doit alors permettre une guérison complète. Une telle approche est même essayée dans le cas où la maladie est due à l'absence d'une activité enzymatique intra-cellulaire (cas des maladies de surcharge par enzymopathie lysosomiale, du déficit immunitaire par carence en adénosine désaminase [ADA] ...).

• **Greffer des cellules ou un organe**

Il est possible de traiter nombre de maladies génétiques en remplaçant l'organe malade ou responsable de la maladie par celui d'un donneur sain. Ainsi, les greffes de moelle sont-elles couramment pratiquées pour les maladies moléculaires de l'hémoglobine, les greffes de foie pour des désordres du métabolisme hépatique, les greffes de poumon (ou du bloc cœur-poumon) pour les mucoviscidoses, etc.

• **Greffer ou réparer un gène**

La pratique des greffes d'organes, d'indication croissante du fait des progrès des traitements immunosuppresseurs s'opposant au rejet des tissus greffés, souffre néanmoins d'importantes limitations : les risques d'infection du greffon, rendus d'une brûlante actualité par les virus du SIDA ; l'obligation de soumettre les malades greffés à un traitement immunosuppresseur qui affaiblit les défenses contre les infections et comporte d'autres effets secondaires ; le manque dramatique de greffons, enfin. Or, la greffe d'organe pour traiter une maladie génétique peut être, d'une certaine manière, considérée déjà comme une thérapie génique puisque son but est bien de remplacer un tissu contenant le gène malade par un nouveau tissu qui contiendra un gène normal. L'idéal paraît donc évidemment, au lieu de remplacer la totalité de l'organe, et par conséquent la totalité des gènes, de n'apporter ou de ne modifier que

le gène dont l'anomalie, chez le malade, est responsable de la symptomatologie.

Contrairement à toutes les autres formes de traitement des maladies génétiques, la thérapie génique n'a pas encore été pratiquée à une grande échelle et n'en est qu'à ses premiers essais.

Les différents types de thérapie génique

• **La thérapie génique germinale**

Il existe théoriquement deux moyens de pratiquer une thérapie génique germinale. La première consiste à introduire la modification dans toutes les cellules d'un embryon très précoce, voire dans l'unique cellule de l'œuf nouvellement fécondé [1]. Dans ce cas, la modification se retrouvera dans toutes les cellules de l'organisme développé, le *soma* aussi bien que le *germen*. Chez l'animal, cette approche, dénommée **transgénèse**, est maintenant très couramment pratiquée ; elle permet d'obtenir des modèles animaux de maladies humaines, de créer des animaux produisant des substances d'intérêt biologique, ou est utilisée pour étudier le rôle ou le fonctionnement de certains gènes [2-4]. La transgénèse consiste à ajouter un gène au patrimoine génétique d'un organisme, en l'insérant, soit au hasard dans les chromosomes, soit à sa place normale, en remplacement du gène dont l'altération est responsable de la maladie. On parle, dans ce dernier cas, de **recombinaison homologue** [5], applicable à l'animal mais non, dans l'état actuel de nos connaissances, à l'homme, au moins dans le cadre d'une modification génétique de l'embryon entier. En revanche, la transgénèse avec intégration au hasard serait, pratiquement et théoriquement, possible chez l'homme. Une deuxième forme de thérapie génique germinale consisterait, dans un organisme constitué, à intégrer un gène spécifiquement dans les cellules germinales. Il n'existe, jusqu'à présent, aucun moyen de parvenir à un tel résultat. Ainsi, la seule thérapie génique germinale qui pourrait être appliquée à l'homme est-elle la transgénèse par apport d'un nouveau gène dans l'embryon précoce humain ; il

RÉFÉRENCES

1. Palmiter RD, Brinster RL. Transgenic mice. *Cell* 1985 ; 41 : 343-5.
2. Gerlinger P. Animaux transgéniques et oncogénèse. *médecine/sciences* 1989 ; 5 : 166-71.
3. Babinet C, Morello D. Animaux transgéniques : une voie nouvelle pour l'étude du développement. *médecine/sciences* 1986 ; 2 : 253-9.
4. Briand P, Cavard C, Zider A, Grimber G. Transgénèse et maladies virales. *médecine/sciences* 1989 ; 5 : 624-5.
5. Lemarchandel V, Montagutelli X. La recombinaison homologue : de nouvelles perspectives pour la transgénèse. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 18-29.
6. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990 ; 344 : 768-70.
7. Temin HM. Retrovirus vectors for gene transfer. In : Kucherlapati, ed. *Gene transfer*. New York : Plenum Press, 1986 : 149-87.
8. Lehn P. Vecteurs rétroviraux pour le transfert de gènes dans le tissu hématopoïétique *in vivo*. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 791-9.
9. Mann R, Mulligan RC, Baltimore D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 1983 ; 33 : 153-9.
10. Miller AD, Baltimore D. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 1986 ; 6 : 2895-902.

aboutirait à un organisme dont les cellules somatiques seraient génétiquement modifiées et qui transmettrait par ses cellules germinales cette modification à une partie de sa descendance.

• La thérapie génique somatique

La thérapie génique somatique consiste à introduire les modifications génétiques dont on espère qu'elles seront curatrices dans les cellules somatiques d'un organisme constitué, sans modifier les cellules du *germen*. Dans ces conditions, le changement génétique introduit ne sera pas héréditaire. En d'autres termes, les enfants d'un malade traité par thérapie génique somatique auront le même risque d'être porteur de la maladie que si leur géniteur n'avait pas été traité. Selon le type d'affection en cause, deux approches de thérapie génique somatique peuvent être envisagées.

- La greffe de cellules génétiquement modifiées

Cette méthode peut être définie comme une auto-greffe de cellules génétiquement modifiées en dehors de l'organisme. Les cellules d'un organe atteint par une maladie génétique sont prélevées chez le malade, traitées en dehors de l'organisme par introduction d'un gène normal palliant la déficience de leur propre gène non fonctionnel, puis réintroduites chez le malade. Il n'y aura pas, dans ce cas, de rejet systématique du greffon puisqu'il est rigoureusement identique aux autres cellules du malade à l'exception de ce nouveau gène qu'il possède et dont on espère qu'il normalisera les fonctions de l'organe altéré par la maladie génétique. En revanche, une réaction immune contre la protéine codée par le transgène est possible. Pour qu'une telle démarche puisse être envisagée, il faut évidemment que la maladie génétique n'altère qu'un seul organe dont les cellules peuvent être prélevées et réintroduites. Il en va ainsi des cellules du sang, de la moelle osseuse, peut-être du foie, des vaisseaux de la peau et du muscle, comme cela sera détaillé dans les chapitres suivants.

L'administration *in vivo* d'un vecteur contenant le gène d'intérêt

Chez d'autres malades, l'affection altère un organe dont il est difficile

de prélever ou de réinjecter un grand nombre de cellules (par exemple le cerveau ou le poumon), ou encore s'exprime au niveau d'une grande diversité de cellules et d'organes des sujets atteints. Dans ces cas, il faut envisager d'apporter, sous une forme quelconque, le gène potentiellement curateur directement dans l'organisme. Il peut être difficile, alors, d'éviter que certains de ces gènes ne s'intègrent dans quelques cellules du *germen*. Des maladies aussi fréquentes que la mucoviscidose, la myopathie de Duchenne ou la maladie de Tay-Sachs ne pourraient, probablement, être traitées par transfert de gènes que selon ce schéma.

La thérapie génique germinale

La thérapie génique germinale semble n'avoir, dans l'état actuel de nos connaissances, ni indication, ni légitimité.

• Absence d'indication thérapeutique chez l'homme

Comme cela a été résumé auparavant, chez l'homme la seule possibilité de pratiquer une thérapie génique germinale est d'injecter un gène dans les cellules d'un embryon très précoce. Un tel embryon ne peut guère être obtenu que par fécondation *in vitro*. Une telle fécondation, à partir des gamètes des deux parents à risque d'engendrer un enfant atteint, aboutit à un mélange d'embryons tout à fait normaux et d'embryons porteurs de la tare et (ou) malades, selon le type de transmission. Il ne saurait naturellement être question de tenter de modifier, au hasard, un des embryons sans savoir auparavant s'il est normal ou atteint. Des techniques modernes existent, qui permettront probablement un jour le diagnostic ante-natal et pré-implantatoire, c'est-à-dire pratiqué avant la réimplantation de l'embryon dans les voies génitales de la femme ([6], *m/s* n° 6, vol. 6, p. 600). Cependant, dès lors qu'un tel diagnostic aura permis d'identifier les embryons normaux et les embryons malades, il suffira de ne réimplanter que les premiers pour éviter la naissance d'un enfant malade. Celui qui écarterait l'embryon normal pour tenter de

modifier, avec des résultats incertains... et, de toutes façons, inconstants, l'embryon atteint, serait un fou dangereux. Ainsi, le diagnostic sur l'embryon très précoce d'une maladie génétique, prélude théorique indispensable à une thérapie génique germinale, aboutit en réalité à un tri d'embryons, et non pas à une thérapie génique.

En dehors même de cet aspect du problème, on ne voit pas très bien, au niveau du traitement d'une maladie, quelle pourrait être l'indication d'une thérapie génique germinale. Sa justification pourrait être d'éviter que l'individu traité ne transmette la maladie à ses descendants. Or, de toutes façons, et même après thérapie génique germinale, 50 % des gamètes de l'individu issu d'un embryon ayant subi un tel traitement continueront de transmettre la tare.

En réalité, il n'existe que deux cas d'école où l'intervention sur les cellules germinales humaines pourrait avoir une indication thérapeutique. Le premier est celui d'une maladie héréditaire frappant primitivement... les cellules intervenant dans la gamétogenèse (diverses et exceptionnelles formes de stérilité génétique par anomalie fonctionnelle des gamètes). Le second est celui des homozygotes, pour des maladies dominantes, désirant avoir des enfants (par exemple, des sujets atteints de chorée de Huntington, de polykystose rénale héréditaire dominante, chez lesquels les exceptionnels homozygotes pourraient n'être pas beaucoup plus gravement atteints que les hétérozygotes).

• La tentation de l'eugénisme

Le fantasme pourrait naturellement exister, non pas de guérir une maladie, mais de conférer un avantage à l'enfant à naître, c'est-à-dire de créer un homme génétiquement nouveau. De telles pratiques destinées à créer de nouvelles lignées d'individus « améliorés » sont couramment employées dans le monde animal et le règne végétal : nos connaissances des possibles interactions entre un caractère génétique ajouté et l'ensemble des gènes préexistants sont si rudimentaires que le résultat est parfois fort éloigné des espérances. Ainsi, des porcs transgéniques pour un gène supplémentaire d'hormone

de croissance, loin d'avoir les pharaneuses caractéristiques escomptées, se révélèrent-ils plutôt maladiés et stériles ! Selon nous, outre son caractère follement incertain, deux raisons essentielles devraient inciter à refuser l'éventualité même d'une telle entreprise de modification génétique de l'homme.

Le but serait ici non pas de soigner l'homme ... mais d'améliorer l'espèce, ce qui s'appelle, au sens étymologique du terme, de l'eugénisme, conception pervertie de la génétique dont l'utilisation passée est suffisamment dans la mémoire de tous pour qu'elle ne puisse pas être considérée autrement qu'avec la plus extrême défiance ... pour rester sobre.

Créer, enfin, des êtres génétiquement « favorisés », si cela se pouvait, serait réintroduire, dans la finalité de la démarche humaine, l'organisation de l'inégalité ... ici de la pire d'entre elles, de l'inégalité biologique. Ce faisant, nul doute que nous nous trouverions face à une formidable régression de la conscience humaine dont l'élévation se confond certainement, au moins en partie, avec la lutte pour l'égalité.

S'il est vrai que la thérapie génique germinale chez l'homme n'a pas d'indication thérapeutique véritable et semble peu acceptable au plan de l'éthique, le lecteur pourrait s'étonner de ce que nous consacrons tant de lignes à un problème inexistant. En réalité, le débat existe effectivement, un important courant scientifique, notamment bien représenté aux États-Unis et en Angleterre, considérant que l'on ne doit écarter *a priori* aucune perspective, en l'occurrence d'un avenir lointain, et que chercher à améliorer génétiquement l'homme demeure une ambition légitime. En plusieurs circonstances de congrès internationaux*, les scientifiques se situant sur cette position ont ainsi incité leurs collègues à refuser des textes de synthèse affirmant clairement que, dans l'état actuel des connaissances, il fallait s'interdire

* Notamment à Valence, à Tokyo et Inuyama city en 1990. Voir *Hum Gene Ther* 1991 ; 2 : 123-9.

toute intervention volontaire sur le patrimoine héréditaire.

La thérapie génique somatique

• Greffe de cellules génétiquement modifiées

Il faut bien distinguer les problèmes posés par la thérapie génique somatique utilisant la greffe de cellules génétiquement modifiées de celle devant faire appel à l'administration *in vivo* d'un vecteur contenant le gène d'intérêt. Le premier type d'approche ne pose pas plus de problèmes éthiques qu'une greffe d'organes, voire moins, puisqu'on n'y trouve point cette relation, parfois éprouvante, entre cette mort d'où viendra un greffon et cette vie s'en saisissant pour se perpétuer, ainsi que deux relayeurs se transmettent le témoin. Les problèmes sont ici ceux inhérents à tout essai thérapeutique, prenant en compte la comparaison entre le traitement proposé et les traitements préexistants, ainsi que les risques thérapeutiques de l'abstention ou de toute autre sorte de soins. C'est dire que ces tentatives devront être évaluées encore très longtemps au cas par cas, la décision finale s'appuyant sur la solidité des travaux antérieurs destinés à démontrer, par exemple sur des modèles animaux, l'efficacité et l'innocuité des thérapies envisagées.

Techniquement, les problèmes à résoudre et les choix à faire sont ceux du mode d'introduction de la séquence d'ADN, du contrôle de son expression et de la nature des cellules utilisées.

- Mode d'introduction et nature des séquences d'ADN à transférer

Le transfert d'ADN dans des cellules cultivées et destinées à être réimplantées se doit d'être très efficace afin de limiter au maximum les opérations de sélection des cellules effectivement modifiées ; ces opérations risquent, en effet, de modifier les caractéristiques des cellules, notamment leurs propriétés essentielles d'auto-renouvellement et de différenciation, propriétés fondamentales pour la pérennité et le bon fonctionnement de l'auto-greffon.

Les virus, et avant tout les rétrovirus, sont donc un outil de choix permettant d'infecter, avec une très

RÉFÉRENCES

11. 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.
12. Cone RD, Mulligan RC. High efficiency gene transfer into mammalian cells : generation of helper-free recombinant retroviruses with broad mammalian host range. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 6349-53.
13. Temin N. Safely considerations in somatic gene therapy of human diseases with retrovirus vectors. *Hum Gene Ther* 1990 ; 1 : 111-123.
14. Kahn A, Briand P. Nouvelles orientations pour la thérapie génique. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 144-9.
15. Rosenberg S, Aebersold P, Cornetta K, et al. Gene transfer into humans. Immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990 : 323 : 570-8.
16. Briand P. Modèles animaux de thérapies géniques. *J Genet Hum* 1988 ; 37 : 289-97.
17. Shesel Y EG, Kim HS, Shehee WR, Papayanopoulou T, Smithies O, Popovitch BW. Correction of a human β -globin gene by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 4294-8.
18. Higgs DR, Wood WG, Sharpe JJ, Lida J, Pretorius IM, Ayyub H. A major positive regulatory region located far upstream of the human α -globin gene locus. *Genes Dev* 1990 ; 4 : 1588-601.
- bonne efficacité, une grande variété de cellules cultivées, à condition qu'elles soient en phase proliférative [7, 8]. Les constructions d'ADN rétroviral et les lignées cellulaires permettant l'encapsulation des ARN rétroviraux recombinants par complémentation en *trans* [9] se sont encore beaucoup améliorées ces derniers temps ([10-14], *m/s n° 5, vol. 7, p. 522*), augmentant la sécurité et l'efficacité du système qui est, à ce jour, le seul à avoir été utilisé dans des essais thérapeutiques chez l'homme ([15], *m/s n° 1, vol. 7, p. 83*) et est celui qui a, de loin, été l'objet du plus grand nombre d'expériences chez l'animal [16]. Les limites et les incertitudes persistantes liées aux vecteurs rétroviraux concernent toujours la taille maximum de la séquence qu'il est ainsi possible de transférer (environ 8 kpb) et le risque, théorique, de l'activation anormale d'une séquence oncogénique endogène localisée à proximité du site d'intégration de l'ADN proviral. Quoique nul résultat expérimental ne soit venu confirmer la réalité d'un tel risque avec les vecteurs utilisés, il est évident que l'intégration des séquences d'ADN thérapeutique en un site choisi, au mieux le gène dont il faut pallier l'anomalie structurale et fonctionnelle, constituerait une voie idéale. La recombinaison homologue permet d'envisager une telle approche, dont la spécificité et la précision peuvent aller jusqu'à changer spécifiquement le nucléotide responsable d'une mutation ponctuelle délétère, comme celle a été récemment démontré pour la mutation drépanocytaire de la chaîne β de l'hémoglobine ([17], *m/s n° 7, vol. 7, septembre 91, p. 735*). La détection des événements de recombinaison homologue au sein des événements de recombinaison aléatoire (de plusieurs dizaines à plusieurs milliers de fois plus fréquents, selon les cas) est cependant toujours une entreprise ardue nécessitant une ou plusieurs sélections en culture cellulaire. Quoique ces opérations permettent à des cellules souches embryonnaires ES de conserver leur totipotence et de contribuer ainsi à la formation de tous les tissus de l'animal, il est loin d'être établi qu'une même conservation des potentialités de différenciation sera observée avec d'autres cellules, par exemple d'origine médullaire. Dans ce cas, en effet, les cellules souches autorenouvelables ne constituent qu'une petite minorité des cellules disponibles et semblent fonctionnellement fragiles, si bien que le risque pourrait être grand qu'aucune d'entre elles, à la fois ait été transfectée, ait subi un événement de recombinaison homologue et soit restée capable de régénérer les différentes lignées hématopoïétiques.
- Quel que soit le mode d'introduction du transgène utilisé, se pose le problème de son expression qualitative et quantitativement correcte, c'est-à-dire du contrôle par des séquences régulatrices appropriées qui ne doivent pas être irréversiblement inactivées à un stade quelconque de la différenciation cellulaire. Les rapides progrès faits dans la caractérisation des promoteurs et des séquences stimulatrices ou modulatrices diverses des gènes cellulaires permettent aujourd'hui d'envisager des solutions satisfaisantes dans la majorité des cas. Par exemple, l'expression physiologique des gènes de globine (quantitativement très importante et très étroitement réglée au cours de l'érythropoïèse) a longtemps été considérée comme probablement impossible à reproduire au niveau d'un transgène. La découverte des éléments distaux appelés LCR (*locus control region*) au niveau des gènes de globine β (*m/s n° 4, vol. 5, p. 252*) et, plus récemment, α [18] et la démonstration qu'ils conféraient à un gène de globine, localisé à proximité, la propriété de s'exprimer fortement et de manière appropriée quelle que soit sa localisation dans le génome, permet maintenant d'envisager la cure de thalassémies ou d'autres hémoglobinopathies par transfert de gène.
- *Les cellules utilisables comme véhicules de transgènes thérapeutiques*
- Deux situations différentes peuvent être schématiquement opposées selon que la cellule à modifier est celle où s'exprime la maladie et qu'il faut donc impérativement corriger, ou bien ne constitue qu'un système de délivrance d'une protéine thérapeutique ou d'un médiateur chimique dans la circulation générale ou en un site précis (par exemple, le système nerveux central dans des affections

neuro-dégénératives). Dans le premier cas, la nature du matériel biologique est imposée par les circonstances : cellules souches médullaires pour les hémoglobinopathies et d'autres affections immuno-hématologiques, hépatocytes pour des maladies du métabolisme hépatique, éventuellement myoblastes en culture pour des affections musculaires. Dans la seconde éventualité, le « thérapeute génique » choisira les cellules sur la base de la facilité de leur obtention, de leur culture et de leur modification génétique, de leur croissance et de leur autorenouvellement *in vivo*, de leur aptitude à délivrer la substance thérapeutique sous une forme active au niveau de leur cible (circulation ou tissu particulier), enfin. Nous avons déjà indiqué dans *m/s* que les cellules endothéliales, les kératinocytes, les fibroblastes et, pour certains usages, les lymphocytes circulants pouvaient constituer d'intéressants systèmes [14]. Les cellules endothéliales pourraient être utilisées associées à des supports synthétiques, greffons vasculaires ou fibres de Gore-Tex® autour desquelles se développe une néovascularisation formant des organoïdes [14]. En dehors même de leur emploi dans les maladies musculaires, les myoblastes constituent également de potentiels véhicules de transgènes thérapeutiques destinés à délivrer une substance donnée dans la circulation. Les muscles contiennent en effet, même chez l'adulte, des cellules « satellites » qui peuvent, *in vivo* (en cas de régénération musculaire) ou *ex vivo* (dans des conditions de culture) se diviser très activement tout en gardant tout leur potentiel myogénique. Des myoblastes pourraient ainsi être multipliés *ex vivo*, infectés par un rétrovirus recombinant puis réinjectés en des sites multiples dans les masses musculaires. Ils devraient fusionner entre eux aussi bien qu'avec des cellules myogéniques résidentes, donnant des myotubes synthétisant la substance d'intérêt ... [19, 20] et peut-être un *pool* de cellules satellites recombinées qui pérenniseraient la présence du transgène.

- *Transfert direct d'ADN dans l'organisme*
La technique d'autogreffe de cellules modifiées qui vient d'être décrite ne permet pas d'envisager le traitement

d'anomalies héréditaires qui nécessitent d'être corrigées, soit dans une très large proportion des cellules, soit dans des cellules que l'on ne peut pas manipuler *ex vivo*, soit encore très précocement, au cours de la période néonatale. Dans ces cas particuliers, une thérapie génique par transfert direct d'ADN dans l'organisme pourrait en revanche être opérationnelle. Divers véhicules de transfert direct d'ADN chez l'animal ont été testés, la plupart conduisant à des résultats encore très décevants. Les liposomes, initialement utilisés pour cibler des enzymes vers un type cellulaire donné, n'ont jusqu'à présent pas fait la preuve de leur efficacité [21]. Cette possibilité de ciblage, non seulement de l'expression, mais aussi de l'ADN transgénique vers un organe, est pourtant extrêmement importante car elle écarterait le risque de modification de la lignée germinale. L'injection de particules virales recombinantes se heurte évidemment à cette difficulté. Par ailleurs, et plus encore que dans la stratégie d'autogreffe de cellules modifiées, les risques d'activation d'oncogènes par mutagenèse insertionnelle ne peuvent être écartés. C'est pourquoi la recherche de vecteurs viraux performants et présentant le minimum de risques pathogènes prend tout son intérêt. A côté des rétrovirus dont les séquences activatrices ont été délétées, les adénovirus dont l'efficacité comme vecteurs de thérapie génique a été testée chez la souris, peuvent être considérés comme de bons candidats. Le système du vecteur adénoviral a déjà été présenté en détail dans *m/s* [22] et ailleurs [23]. Rappelons que le virus recombinant est obtenu, comme pour les rétrovirus, par un système d'empaquetage *ex vivo* (complémentation en *trans*) et qu'il peut infecter une très grande diversité de cellules, même celles qui ne se divisent pas, ce qui constitue une très intéressante caractéristique puisque des tissus — cibles potentielles de la thérapie génique — sont justement le siège d'une activité proliférative faible (foie, muscle) ou nulle (neurones du cerveau). Les vecteurs utilisés jusqu'alors n'avaient pas la capacité d'accepter plus de 8 kpb d'ADN recombinant, mais il est possible d'envisager des constructions adénovirales de nou-

velle génération acceptant des insertions de 30 kpb (Michel Perricaudet, communication personnelle). Ces nouveaux vecteurs seront également d'un niveau de sécurité accru en ce qu'ils seront défavorisés par rapport au génome viral sauvage pour l'encapsidation, ce qui devrait diminuer les risques de production de virus recombinant par un malade ainsi traité et surinfecté par une souche sauvage d'adénovirus (Michel Perricaudet, communication personnelle). Le virus recombinant étant défectueux pour la réplication, l'ADN recombinant n'est normalement pas amplifié dans les cellules infectées ; son devenir reste incertain ; il demeure certainement extrachromosomique pour une grande partie, la possibilité d'intégration dans le génome hôte n'ayant été formellement, ni démontrée, ni éliminée. Une situation extrachromosomique aurait l'avantage de limiter des interférences possibles avec les gènes endogènes... et l'inconvénient d'être probablement associée à une plus grande instabilité, surtout dans les cellules en mitose au niveau desquelles on peut s'attendre à ce que de l'ADN non-génomique et non-autorépliquatif se dilue et soit inégalement transmis aux cellules filles. Des expériences préliminaires sur l'animal ont démontré que des gènes transférés *in vivo* dans des vecteurs adénoviraux s'exprimaient pendant plusieurs jours à plusieurs semaines dans l'épithélium bronchique ([24], *m/s* n° 1, vol. 7, p. 84), le muscle, le cœur, le foie (*figure 1*) [23].

S'il n'est pas aisé de cibler l'infectivité des particules virales pour des tissus particuliers (cela nécessiterait d'intervenir sur les protéines d'enveloppe des virus), on peut, en revanche, limiter le volume de diffusion des particules recombinantes, soit par administration locale (intramusculaire, aérosol ou instillation bronchique [24]), soit par dérivation circulatoire temporaire de l'organe à traiter. J.M. Heard et O. Danos (Institut Pasteur, Paris) viennent ainsi de montrer que, associée à une hépatectomie partielle, cette technique permettait à un vecteur rétroviral de « transduire » efficacement un transgène dans le foie (*m/s* n° 5, vol. 7, p. 522). Le rôle de l'hépatectomie

était ici de stimuler la division des hépatocytes, nécessaire à leur infection par les rétrovirus recombinants [25]. L'expression du transgène peut, quant à elle, être facilement ciblée grâce à l'utilisation de séquences régulatrices spécifiques.

Thérapie génique chez l'animal : une réalité

Les deux stratégies de thérapies géniques, à savoir les autogreffes de cellules modifiées et le transfert direct d'ADN dans l'organisme, en particulier par infection virale, ont été testées sur divers modèles animaux : souris, rats, lapins, chiens, porcs, singes, etc. Leur efficacité, au moins à moyen terme, a pu être, dans certains cas, démontrée. Parmi les résultats spectaculaires, il faut citer les mini-greffes d'hépatocytes recombinés ayant permis de faire apparaître de la bilirubine conjuguée dans la bile de rats Gunn déficients en UDP glucuronyl transférase ainsi que de l'albumine dans le sang de rats albuminémiques (*m/s*, n° 5, vol. 3, p 303). En revanche, des hépatocytes infectés par des rétrovirus contenant le gène du récepteur des LDL et réinjectés dans la cavité péritonéale de lapins Watanabe, déficients en ce récepteur, n'ont pas permis d'obtenir un résultat durable sur l'hypercholestérolémie de ces animaux [26].

Il apparaît clairement que chaque déficit, parce qu'il touche un organe particulier, parce qu'il affecte la synthèse de protéines dont l'efficacité requiert des conditions de localisation ou de régulation propres, parce qu'il doit être corrigé plus ou moins précocement, sera un cas particulier au regard de l'élaboration d'une thérapie génique. Cette élaboration nécessitera le plus souvent, ou sera facilitée par l'existence de modèles animaux dont la production est aujourd'hui rendue possible grâce aux techniques des souris transgéniques et de la recombinaison homologue.

Une fois le modèle créé, la transgénèse est encore d'une grande utilité pour ces mises au point thérapeutique, et cela à plusieurs niveaux. Le cas des déficits murins en ornithine transcarbamylase (OTC), déficit lié à l'X affectant l'efficacité du foie à

détoxifier l'ammoniaque de l'organisme, en est un bon exemple. Le transfert, dans des embryons mutés, d'un ADNc codant pour la protéine normale muni de séquences régulatrices localisant l'expression dans le foie a tout d'abord permis de démontrer que la correction d'un déficit enzymatique par transfert de gène était possible [27, 28]. Puis l'utilisation d'une autre séquence régulatrice a permis, récemment, de démontrer qu'une expression normale de l'OTC dans les cellules de la muqueuse intestinale permettait aussi de corriger les anomalies du métabolisme de l'ammoniaque [29]. Au vu de ces résultats, c'est aujourd'hui dans diverses directions que peut se développer l'élaboration de thérapies géniques somatiques des déficits en ornithine transcarbamylase. Les cellules corrigées pourraient être les hépatocytes ou les cellules intestinales, que le mode de transfert soit direct ou, probablement à plus longue échéance, qu'il fasse appel à l'autogreffe.

Thérapie génique chez l'homme : premiers essais, candidats potentiels et perspectives

La première tentative de thérapie génique au sens strict fut réalisée en 1970 dans le cadre d'un déficit héréditaire du métabolisme : le déficit en arginase. Elle fut effectuée par un virologue qui, travaillant sur le virus de Shope, avait pu constater sa capacité à diminuer la quantité d'arginine chez des animaux ou des hommes infectés. Ces derniers ne présentant par ailleurs aucun trouble et des fibroblastes de patients atteints d'un déficit en arginase ayant acquis une telle activité après infection, il fut jugé raisonnable d'envisager une thérapie par infection à l'aide de ce virus. Elle fut tentée sur deux malades, devant la gravité des symptômes et l'échec des traitements habituels. Cette thérapie génique directe fut malheureusement inefficace. Dix ans plus tard, la thérapie génique d'une β -thalassémie par autogreffe de cellules modifiées fut tentée, là encore sans succès. Comme dans le premier cas, cet échec ne s'était pas accompagné de conséquences délétères liées

RÉFÉRENCES

19. Labrecque C, Bouchard JP, Malouin F, Roy R, Huard J, Tremblay JP. Approche thérapeutique de la myopathie de Duchenne par transplantation de myoblastes. *médecine/sciences* 1991 (sous presse).
20. Salminen A, Elson FH, McKley LA, Fojo AT, Gottesman MM. Implantation of recombinant rat myocytes into adult skeletal muscle : a potential gene therapy. *Hum Gene Ther* 1991 ; 2 : 15-26.
21. Machy P, Luserman L. Liposomes in cell biology and pharmacology. Paris : INSERM/John Libbey Eurotext, 1987.
22. Chasse JF, Levrero M, Kamoun P, Minet M, Briand P, Perricaudet M. L'adénovirus : vecteur de thérapie génique ? *médecine/sciences* 1989 ; 5 : 331-7.
23. Stratford-Perricaudet LD, Levrero M, Chasse JF, Perricaudet M, Briand P. Evaluation of the transfert and expression in mice of an enzyme encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum Gene Ther* 1990 ; 1 : 241-56.
24. Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K, et al. Adenovirus mediated transfer of a recombinant $\alpha 1$ antitrypsin gene to the lung epithelium *in vivo*. *Science* 1911 ; 252 : 431-4.
25. Kaleko M, Garcia JV, Miller AD. Persistent gene expression after retroviral gene transfer into liver cells *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1991 ; 2 : 27-32.
26. Wilson JM, Johnston DE, Jefferson DM, Mulligan RC. Correction of the genetic defect in hepatocytes from Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 4421-5.

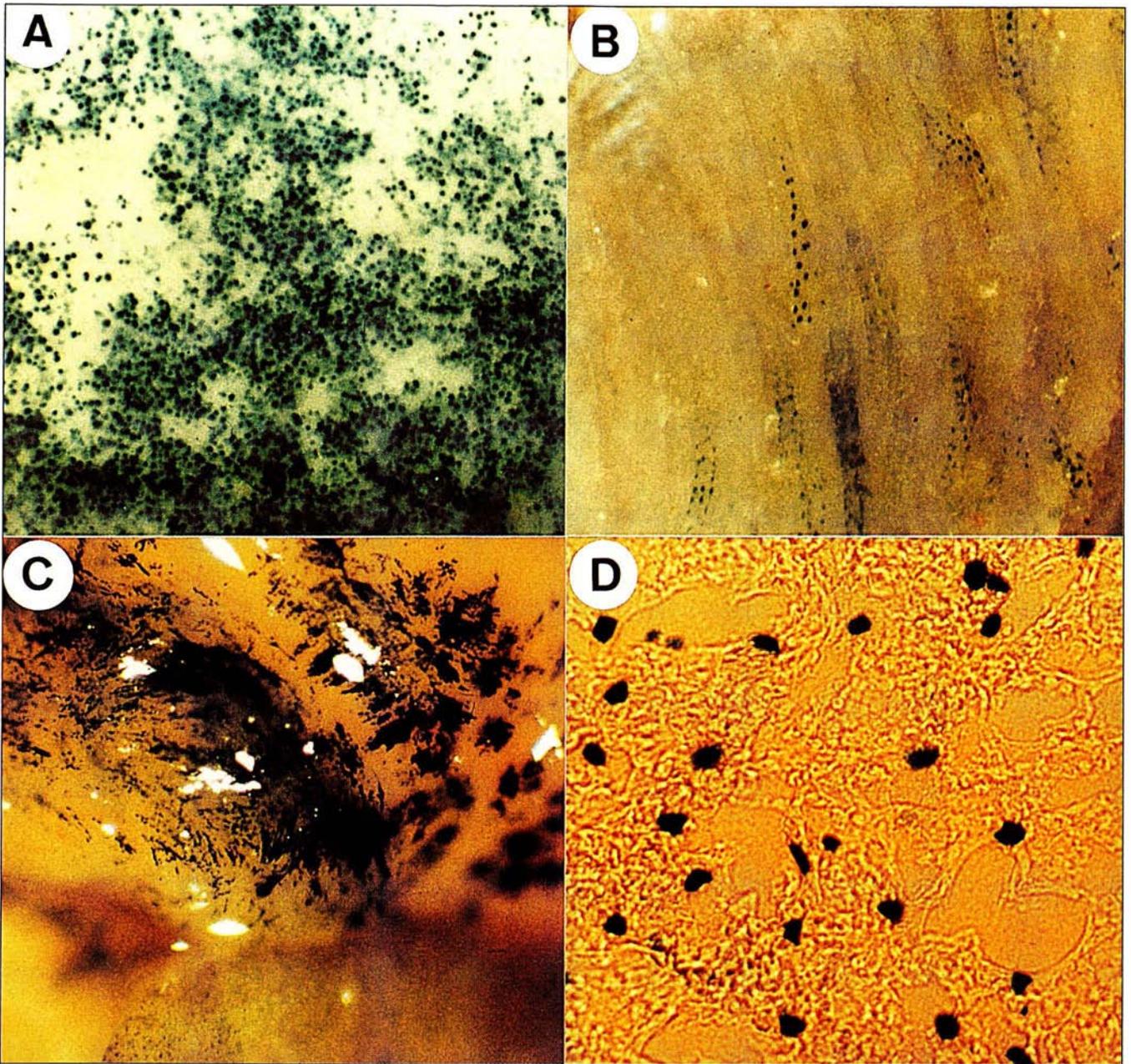


Figure 1. **Expression du gène rapporteur nlsLacZ dans divers tissus murins, 15 jours après introduction par voie intraveineuse d'un adénovirus recombinant Ad-RSV-nls LacZ.** Le gène nlsLacZ (nls : nuclear localization signal ; signal de localisation nucléaire) code pour une β -galactosidase modifiée, dont l'activité nucléaire peut être révélée in situ. Après fixation au formol, les organes ou coupes d'organes sont incubés à 37°C pendant 12 heures en présence du substrat X-gal. Le clivage du substrat X-gal par la β -galactosidase permet la formation d'un produit chromogénique qui peut être précipité en présence de ferri- et de ferrocyanure. Le noyau des cellules exprimant le gène lacZ apparaît en bleu foncé sur les illustrations. Tous les organes ont été prélevés 15 jours après l'injection intraveineuse de l'adénovirus recombinant Ad-RSV-nls LacZ dans lequel le gène nlsLacZ est placé sous le contrôle des séquences régulatrices du virus RSV (roux sarcoma virus). A : Foie. B : muscle squelettique. C : muscle myocardique. A, B, C, macroscopies X40 ; D : poumon (coupe cryostat X 400). Résultats obtenus en collaboration par les équipes des Drs Pascale Briand (ICGM) et Michel Perricaudet (IGR).

RÉFÉRENCES

27. Cavard C, Grimber G, Dubois N, *et al.* Correction of a mouse ornithine transcarbamylase deficiency by gene transfer into the germline. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 2099-10.
28. Cavard C, Grimber G, Chasse JF, *et al.* Correction d'un déficit enzymatique murin par transfert de gène. *médecine/sciences* 1987 ; 3 : 38-40.
29. Jones SN, Grompe M, Munir MI, Veres G, Craigen WJ, Caskey CT. Ectopic correction of ornithine transcarbamylase deficiency in sparse fur mice. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 14684-90.
30. Ledley FD. Clinical considerations in the design of protocols for somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 1991 ; 2 : 77-83;
31. Culver KW, Anderson WF, Blaese RM. Lymphocyte gene therapy. *Hum Gene Ther* 1991 ; 2 : 107-9.
32. Baltimore D. Intracellular immunization. *Nature* 1988 ; 335 : 395-6.
33. Levy JP. Traitements du SIDA : recherche de nouveaux médicaments et élaboration de thérapie génique. *médecine/sciences* 1991 (sous presse).
34. Boyer-Neuman C, Wolf M, Larrieu MJ. Les maladies thromboemboliques constitutionnelles. *médecine/sciences* 1987 ; 3 : 216-22.
35. Bernard O, Fischer A, Grunfeld JP. La transplantation d'organe comme traitement des maladies métaboliques. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 406-12.

à ce type d'approche thérapeutique, mais l'ADN utilisé était un ADN recombinant dont l'innocuité après transfert dans l'organisme était, à l'époque, discutée. Cela justifia la mise en place de comités d'éthiques ayant pour mission d'établir en ce domaine les prérequis indispensables. De nombreuses études furent donc menées sur des modèles cellulaires et animaux.

Si l'application à l'espèce humaine n'en est encore qu'à ses balbutiements, le fait important pour l'évolution de cette approche thérapeutique est qu'elle commence à être autorisée. D'une part, la barrière psychologique est ainsi franchie, d'autre part, les premiers essais thérapeutiques sur l'homme, qui peuvent seuls permettre une application ultérieure à grande échelle, peuvent être entrepris [30].

Les résultats des premières expériences d'autogreffe de cellules modifiées chez l'homme ont été récemment publiés et semblent prometteurs. Il s'agissait de lymphocytes particuliers (TIL : *tumor infiltrating lymphocyte*), dans lesquels un marqueur de résistance à un antibiotique actif sur les cellules de mammifères avait été introduit dans le dessein de pouvoir suivre le devenir de ces lymphocytes chez des malades souffrant de mélanomes métastasés. Ces lymphocytes réimplantés sont demeurés plusieurs semaines dans l'organisme, en particulier au niveau de la tumeur ([15], *m/s* n° 1, vol. 7, p. 83). La prochaine étape consiste à introduire dans ce type de lymphocytes un gène ayant une possible action antitumorale du type TNF (*tumor necrosis factor*).

L'utilisation de lymphocytes circulants pour administrer un gène d'adénosine désaminase chez une petite malade atteinte de déficit immunitaire combiné par déficit en cette enzyme est également en cours depuis plusieurs mois aux États-Unis [31]. Le traitement génétique reste cependant associé, dans ce cas, à l'injection directe de l'enzyme sous forme stabilisée (PEG-ADA). Le traitement par les lymphocytes génétiquement modifiés s'est révélé dénué d'effets secondaires et une amélioration significative de l'état immunitaire, biologique et clinique, a été constatée. Les lymphocytes circulants,

faciles à prélever, à cultiver et à réinjecter, sont donc les premières cellules utilisées dans des essais thérapeutiques chez l'homme [31]. Dénués de potentialité d'autorenouvellement, ils nécessitent, dans des maladies chroniques (particulièrement les maladies héréditaires), une répétition périodique des opérations (prélèvement des cellules, infection *ex vivo*, réinjection). Ils pourraient, en revanche, être particulièrement bien adaptés au traitement de maladies non génétiques, transitoires.

En effet, les indications de la thérapie génique telles qu'elles se dessinent aujourd'hui incluent tant des maladies génétiques que des maladies acquises. Dans ce cas, les cellules génétiquement modifiées sont considérées comme des usines de production et de distribution d'une substance d'intérêt biologique : facteurs thrombolytiques libérés par des cellules endothéliales tapissant un greffon vasculaire ; anticorps monoclonal dans une immunothérapie passive anti-infectieuse ou anti-tumorale ; dérivés solubles de CD4 chez les malades atteints de SIDA ; facteurs neurotrophiques libérés par des cellules neuronales embryonnaires ou des fibroblastes chez des sujets atteints de maladies neurodégénératives.

Une autre utilisation potentielle de cellules génétiquement modifiées dans le traitement de maladies acquises concerne ce qui a été appelé « l'immunisation intra cellulaire », c'est-à-dire le transfert dans des cellules d'une information génétique les rendant résistantes à une infection virale (ou, potentiellement, parasitaire) [32]. On pourrait ainsi, dans le SIDA, imaginer des autogreffes de moelle résistante aux virus HIV, ou l'infection des malades avec un virus défectueux recombinant véhiculant une telle information. Ces perspectives seront présentées en détail par Jean-Paul Lévy dans un prochain numéro de *m/s* [33].

En ce qui concerne les maladies génétiques, les plus accessibles à une thérapie génique sont des affections monofactorielles secondaires au déficit d'une protéine circulante (maladies de la coagulation, qu'il s'agisse des hémophilies ou des maladies thrombolytiques congénitales [34] et celles dans lesquelles l'organe en

cause n'est pas altéré par le déficit : oxalose ; maladie de Crigler-Najjar, équivalent humain du déficit observé chez le rat Gunn ; hypercholestérolémie familiale ; anomalies du cycle de l'urée ou de la gluconéogénèse [35]. A l'opposé, des déficits entraînant une atteinte de l'organe producteur, par exemple le déficit homozygote en α 1-antitrypsine, s'accompagnant d'un risque de cirrhose et d'hépatocarcinome par surcharge en protéine mutée, restent une indication de greffe classique (*m/s* n° 3, vol. 3, p. 181 et n° 3, vol. 5, p. 182).

L'introduction directe d'un gène dans l'organisme permet d'ajouter à la liste des candidats à une thérapie génique, les malades atteints d'anomalies héréditaires nécessitant d'être corrigées très précocément ou dans une très large proportion de leurs cellules, ou encore dans des cellules difficiles à prélever, telles les cellules musculaires dans le cas des myopathes. Dans ces cas, l'infection à l'aide de virus recombinants pourrait être proposée en l'absence de toute autre approche thérapeutique, en sachant que la possibilité d'une atteinte de la lignée germinale ne serait alors pas nulle.

Conclusion

Rarement approche thérapeutique aura suscité, pendant une si longue période, autant de craintes et d'espoirs que la thérapie génique somatique. Craintes, parce qu'elle était, à tort, rapprochée des manipulations de la lignée germinale effectuées chez l'animal et qu'elle impliquait la technologie des recombinants d'ADN. Espoirs, parce qu'elle était potentiellement applicable au traitement de nombreuses maladies héréditaires, jusque-là hors d'atteinte thérapeutique. Au cours des dix dernières années, les difficultés techniques ont été appréciées et, pour certaines, résolues chez l'animal, les champs d'application ont été élargis, en particulier au traitement de maladies acquises, enfin, les résultats des premiers essais d'application à l'espèce humaine semblent aujourd'hui prometteurs même si, il faut le souligner, le traitement par ces moyens des maladies héréditaires ou acquises les plus fréquentes et les plus graves reste encore probablement lointain,

tant pour des raisons techniques que socio-économiques : certaines d'entre elles (les hémoglobinopathies, le SIDA) sont fréquentes dans des pays dont le niveau de développement économique et technique rend totalement illusoire l'utilisation à une large échelle d'un traitement de ce type qui pourrait, de ce fait, même en cas de succès, demeurer longtemps l'apanage des pays riches ■

Summary

Gene therapy : prospects and limits

Gene therapy is today a popular prospect to which many articles, meetings and a new Journal are devoted. Yet, the way leading to the efficient cure of numerous patients affected with the most common genetic diseases remains uncertain and, in any case, is only beginning. Germinal gene therapy appears to have no indication in the treatment of human diseases and raises serious ethical concerns because its only logical use would be to « improve » (not to cure) human beings, which is typically an eugenic goal, creating, in addition, supplementary and voluntary biological inequalities in Man. In contrast, somatic gene therapy does not raise more ethical questions than any therapeutic trial. Two methods of somatic gene therapy can be distinguished : autograft of cells genetically modified *ex vivo* or direct administration of therapeutic DNA to patients, through the use of viral vectors or, in principle, of liposomes. While the retroviral vectors have proven to be very efficient to infect dividing cultured cells, adenoviral vectors seem to be more promising to transfer DNA in whole organisms because they are able to infect a large variety of dividing and non-dividing cells and have been demonstrated to be able to correct by such *in vivo* administrations a mouse model of human disease.

TIRÉS A PART

A. Kahn.