

Thérapie génique des maladies lysosomales

Livia Poenaru

Les maladies lysosomales sont des affections monogéniques dues au déficit des enzymes intralysosomales impliquées dans le catabolisme de macromolécules. Leur gravité clinique et l'absence, pour la plupart d'entre elles, de traitement efficace rendent prioritaires les tentatives de mise au point de thérapies géniques. Les gènes des enzymes normales sont en majorité clonés et les ADNc ont des tailles compatibles avec leur transfert par l'intermédiaire des vecteurs viraux existants. La faible quantité d'enzyme néo-synthétisée nécessaire pour modifier de façon considérable le tableau clinique est un facteur d'espoir pour le succès de telles tentatives de thérapie génique. Plusieurs stratégies sont actuellement à l'essai dans des modèles animaux, et des protocoles pour une application clinique ont été soumis. Bien des problèmes restent cependant à résoudre avant de tirer une conclusion quant à l'efficacité des approches envisagées.

Réprésentées par une quarantaine d'affections génétiques distinctes, en majorité récessives autosomiques, les maladies lysosomales sont dues à un déficit des enzymes intervenant dans le catabolisme des molécules complexes: glycolipides, glycoprotéines, mucopolysaccharides, etc. L'absence de dégradation de ces molécules entraîne leur accumulation et une cascade d'anomalies métaboliques qui se répercutent sur le fonctionnement de la cellule. Selon le déficit enzymatique, on distingue des maladies à expression principalement neurologique (neurolipidoses ou sphingolipidoses), le plus souvent rapidement mortelles, et des maladies à expression viscérale, d'évolution plus lente dans un tableau d'organomégalie et de dysmorphie (surtout mucopolysaccharidoses). Les symptômes auxquels elles sont associées

peuvent être un retard psychomoteur profond ou des troubles neurologiques plus atténués, une hépatosplénomégalie, des déformations squelettiques, des opacités cornéennes et des troubles sensoriels [1]. Considérées individuellement, ces maladies sont rares, mais dans l'ensemble elles ont une fréquence de 1/5 000-1/10 000 naissances. Les maladies lysosomales sont très hétérogènes et, si la plupart se manifestent dès la petite enfance avec des symptômes sévères, il existe pour plusieurs d'entre elles des cas avec manifestations cliniques tardives, les formes adultes, dues le plus souvent à la persistance d'une faible activité enzymatique résiduelle.

Les maladies lysosomales ont été isolées comme syndromes cliniques depuis plus d'un siècle, mais leurs mécanismes étiopathogéniques ont été dévoilés seulement au cours des dernières décennies. C'est ainsi

ADRESSE

L. Poenaru : *professeur de génétique*. Laboratoire de génétique, CHU Cochin, université René-Descartes Paris-V et ICGM, Inserm U. 129, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

RÉFÉRENCES

1. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. *The metabolic basis of inherited diseases*, 6th ed. New York: Mc Graw-Hill Book Inc, 1989: 1565-839.
2. Von Figura K, Hasilik A. Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 167-93.
3. Meresse S, Bauer U, Ludwig T, Mauxion F, Schmidt A, Hoflack B. Bases moléculaires du transport vers les lysosomes. *médecine/sciences* 1993; 9: 148-56.
4. Rambourg A, Clermont Y. L'appareil de Golgi: apport de la microscopie électronique tridimensionnelle à l'étude de sa structure et de ses fonctions. *médecine/sciences* 1990; 6: 35-45.
5. Poenaru L. Le diagnostic prénatal des maladies héréditaires du métabolisme. In: Ionescu S, ed. *La déficience intellectuelle. Approches et pratiques de l'intervention, dépistage précoce*. Ottawa: Nathan Université Agence d'Arc, 1993: 262-79.
6. Akli S, Boué J, Sandhoff K, Kleijer W, Vamos E, et al. Collaborative study of molecular epidemiology of Tay-Sachs disease in Europe. *Eur J Hum Genet* 1993; 1: 229-38.
7. Brady RO, Barton NW, Grabowski GA. The role of neurogenetics in Gaucher disease. *Arch Neurol* 1993; 50: 1212-24.
8. Thomas GH. Pseudodeficiencies of lysosomal hydrolases. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 934-40.
9. Warren Tay, en Grande-Bretagne, décrit les caractéristiques cliniques de l'idiotie amaurotique infantile et qu'en 1896 Bernard Sachs, aux États-Unis, souligna son caractère familial, donnant ainsi leurs deux noms à la maladie de Tay-Sachs. A Paris, en 1882, Philippe Gaucher décrit dans sa thèse de doctorat le premier cas d'hépatosplénomégalie accompagnée d'une surcharge réticuloendothéliale, qui portera son nom. Plus tard, le terme de thésaurosmose désigna divers états pathologiques caractérisés par la mise en réserve anormale dans les tissus de lipides, glucides ou peptides, et fit naître le concept de surcharge métabolique.
10. En 1955, Christian de Duve, à Louvain (Belgique), décrit les lysosomes comme des particules lytiques entourées d'une membrane et contenant des hydrolases acides. Ce n'est qu'en 1971 qu'Elisabeth Neufeld et ses collaborateurs au NIH (USA), en cocultivant des fibroblastes provenant de sujets atteints de maladies de surcharge distinctes, découvrirent des « facteurs de correction », qui compensaient réciproquement les anomalies des cellules en culture. Ces facteurs de correction furent identifiés ultérieurement aux enzymes lysosomales déficientes dans chaque type de maladie.
11. Les recherches de plusieurs équipes, dont celles de William Sly et de Stuart Kornfeld aux États-Unis, et celle de Kurt von Figura en Allemagne, ont conduit à la découverte en 1977 du mannose-6-phosphate (man-6-P) comme marqueur de reconnaissance existant dans la structure des enzymes lysosomales et ont permis de clarifier leur acheminement de l'appareil de Golgi vers les lysosomes par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques: les récepteurs man-6-P [2]. La découverte du récepteur man-6-P a aussi permis d'élucider certains mécanismes pathogéniques impliqués dans la pathologie de transport lysosomal comme la mucopolidose II [1].
12. Une fois synthétisées dans le réticulum endoplasmique (*figure 1-étapes 1, 2*) les enzymes lysosomales passent dans l'appareil de Golgi où a lieu leur glycosylation, puis la phosphorylation (*figure 1-étapes 3, 4*) des mannoses situés aux extrémités glycosidiques [3, 4]. Ainsi structurées, les enzymes peuvent être reconnues par les récepteurs man-6-P qui assurent leur transport vers le lysosome en passant par des compartiments intermédiaires (*figure 1-étapes 5, 6*): vésicules de clathrine puis prélysosomes. Ici, en milieu acide, les enzymes sont libérées du récepteur et celui-ci est recyclé vers le Golgi ou vers la membrane plasmique (*figure 1-étape 7*). Dans les conditions physiologiques, les enzymes lysosomales sont partiellement (10 %) excrétées dans l'espace extracellulaire (*figure 1-étape 8*) d'où elles peuvent être réinternalisées par endocytose par les cellules environnantes grâce aux récepteurs man-6-P présents également à la surface cellulaire (*figure 1-étape 9*). Cette possibilité constitue un élément majeur à considérer dans les différentes approches thérapeutiques et peut être envisagée dans les corrections enzymatiques croisées ou à distance.
13. L'identification successive des déficits enzymatiques responsables de chacune des maladies lysosomales a donné les moyens d'un diagnostic précis, et l'évolution des méthodes de prélèvements fœtaux a permis la pratique régulière d'un diagnostic prénatal précoce et fiable pour la majorité de ces maladies [5] (*Tableau I*). Le développement technologique en génétique moléculaire dans les années 1980 a fourni les outils pour la localisation chromosomique des gènes responsables des maladies lysosomales. Actuellement, la majorité des ADNc correspondant à ces gènes sont disponibles et on peut envisager le génotypage (*m/s n° 6-7, vol. 10, p. 749*). Celui-ci peut être: épidémiologique [6], pronostique, comme dans le cas de la maladie de Gaucher où une corrélation génotype-phénotype est possible [7], ou diagnostique, utile dans des cas atypiques, dans les pseudodéficits [8] ou dans la détection des hétérozygotes [9].
14. Si pendant des décennies les possibilités thérapeutiques des maladies génétiques ont été envisagées avec scepticisme, au cours des dernières années des méthodes de traitement pourvues d'une certaine efficacité ont été conçues pour quelques maladies lysosomales. Pour d'autres, des mises au point sont en cours.

RÉFÉRENCES

9. Stone S, Adinolfi M. Carrier detection of deletions of the Hunter gene by *in situ* hybridization. *Ann Hum Genet* 1992; 56: 93-7.
10. Rodman JS, Mercer RW, Stahl PD. Endocytosis and transcytosis. *Curr Op Cell Biol* 1990; 2: 664-72.
11. Olsen I, Muir H, Smith R, Fensom A, Watt DJ. Direct enzyme transfer from lymphocytes is specific. *Nature* 1983; 306: 75-7.
12. Bou-Gharios G, Abraham D, Olsen I. Lysosomal storage diseases: mechanisms of enzyme replacement therapy. *Histochem J* 1993; 25: 593-605.
13. Barranger JA, Ohashi T, Hong CM, Tomich J, Aerts JF, *et al.* Molecular pathology and therapy of Gaucher disease. *Jpn J Inher Metab Dis* 1989; 51: 45-71.
14. Barton N, Brady RO, Dambrosia J, Di Bisceglie A, Doppelt S, *et al.* Replacement therapy for inherited enzyme deficiency-macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1464-70.
15. Beutler E, Kay A, Saven A, Garver P, Thurston D, Dawson A, Rosenbloom B. Enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood* 1991; 78: 1183-9.
16. Barton N, Furbish FS, Murray GJ, Garfield M, Brady RO. Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1913-6.
17. Fallet S, Grace ME, Sibille A, Mendelson DS, Shapiro RS, Hermann G, Grabowski GA. Enzyme augmentation in moderate to life-threatening Gaucher disease. *Pediatr Res* 1992; 31: 496-502.

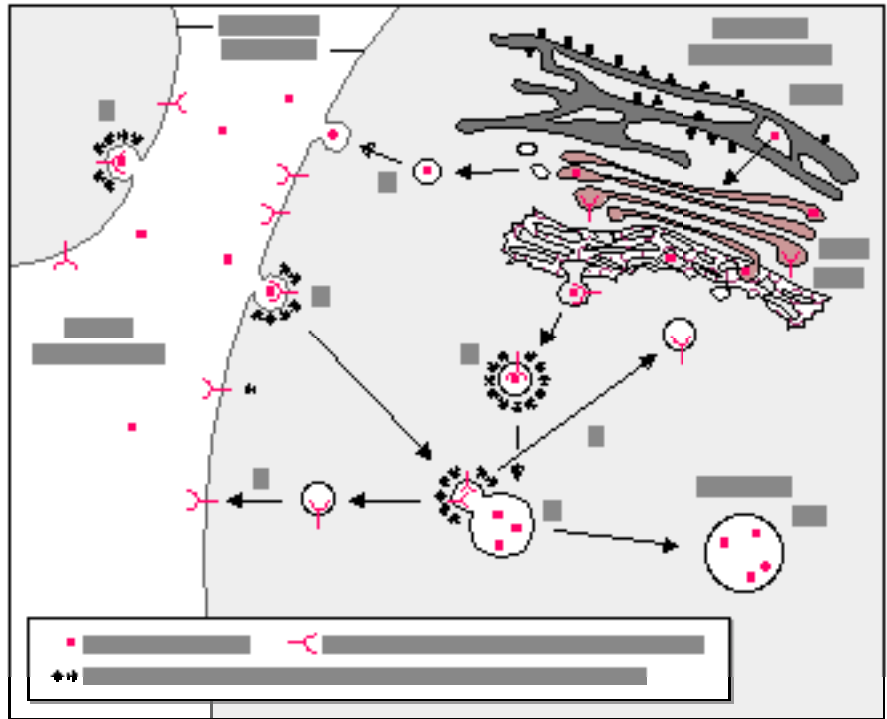


Figure 1. **Transport des enzymes lysosomales et recyclage des récepteurs Man-6-P.** 1: traduction en protéines des ARNm dans le réticulum endoplasmique; 2: glycosylation et élimination de la séquence signal dans l'appareil de Golgi; 3: dans l'appareil de Golgi, synthèse du marqueur de reconnaissance Man-6-P et 4: association des sous-unités; 5: transfert vers le lysosome par l'intermédiaire des récepteurs Man-6-P en passant par des compartiments intermédiaires (vésicules de clathrine et prélysosomes); 6: les enzymes sont libérées de leur récepteur en milieu acide; 7: les récepteurs sont recyclés vers l'appareil de Golgi ou la membrane plasmique; 8: en outre, 10% des enzymes lysosomales sont normalement excrétées dans le milieu extracellulaire et peuvent être internalisées par endocytose par les cellules environnantes grâce à la présence sur ces cellules de récepteurs Man-6-P (9); 10: maturation des enzymes par protéolyse limitée dans le lysosome.

Particularités des maladies lysosomales à considérer pour une stratégie thérapeutique

Les maladies lysosomales présentent des particularités qui doivent être prises en considération dans la conception des méthodes thérapeutiques pour leur assurer un maximum de chances de réussite.

1. Les enzymes lysosomales sont synthétisées dans toutes les cellules de l'organisme (à l'exception des globules rouges). Leur déficit est également ubiquitaire (*m/s n° 1, vol. 2, p. 52*).
2. L'accumulation pathologique des substrats non dégradés a cependant

une prédilection tissulaire selon la maladie (*Tableau II*). Les troubles fonctionnels des organes les plus affectés constituent la base du diagnostic clinique.

3. Les enzymes lysosomales sont partiellement excrétées ($\approx 10\%$ du taux global) à l'extérieur de la cellule et peuvent être reprises par les cellules avoisinantes ou à distance. Cette endocytose est faite par l'intermédiaire de plusieurs systèmes de récepteurs [10] à double spécificité enzymatique et cellulaire. Le récepteur man-6-P, cité plus haut, a un rôle essentiel dans les fibroblastes et divers autres tissus, mais sa présence n'est pas confirmée dans toutes les

Tableau I			
PRINCIPALES MALADIES LYSOSOMALES, DÉFICIT RESPONSABLE ET POSITION DES GÈNES RESPECTIFS			
Maladies lysosomales	Déficit enzymatique	Localisation du gène	
1. Sphingolipidoses			
Tay-Sachs	β -hexosaminidase A	15q23-24	
Sandhoff	β -hexosaminidase A + B	15q13	
Déficit activateur des hexosaminidases	Activateur des hexosaminidases	5	
Landing	β -galactosidase	3p21	
Gaucher	β -glucosidase	1q21	
Niemann-Pick A et B	Sphingomyélinase	11p15	
Niemann-Pick C	Transport de cholestérol	18p	
Krabbe	Cérébroside β -galactosidase	14q24-32	
Fabry	α -galactosidase	Xq21-22	
Leucodystrophie métachromatique	Arylsulfatase A	22q13	
Déficit activateur de l'arylsulfatase	Activateur de l'arylsulfatase	10	
Farber	Céramidase acide	?	
Wolman	Lipase acide	10q23	
2. Mucopolysaccharidoses			
Type I	Hurler	α -L-iduronidase	4p16.3
	Scheie	α -L-iduronidase	4p16.3
Type II	Hunter	L-iduronide sulfatase	Xp28
Type III	Sanfilippo A	Sulfamidase	?
	Sanfilippo B	α -N-acétyl-glucosaminidase	?
	Sanfilippo C	Acétyl-CoA: α -glucosaminide-acétyltransférase	14/21?
	Sanfilippo D	N-acétylglucosamine 6-sulfatase	12q14
Type IV	Morquio A	6 galactose-sulfatase	16q24.3
	Morquio B	β -galactosidase	3p21
Type VI	Maroteaux-Lamy	Arylsulfatase B	5p11-q13
Type VII	Sly	β -glucuronidase	7q21-22
3. Glycoprotéinoses			
α -mannosidose	α -mannosidase	19cen-q13	
β -mannosidose	β -mannosidase	?	
Fucosidose	α -fucosidase	1p34-36	
Aspartylglucosaminurie	Aspartylglucosaminidase	4p32-33	
4. Mucolipidoses			
Type II et III	N-acétylglucosamine-phosphotransférase	4q21-23	
Type I-sialidose	N-acétylneuraminidase	6/10?	
Galactosialidose	Protéine protectrice/cathepsine A	20q13.1	
5. Glycogénoses			
Type II pompe	α -glucosidase	17q23	

cellules. D'autres récepteurs spécifiques du galactose, du mannose ou du fucose peuvent intervenir.

4. Un système direct de transfert enzymatique de cellule à cellule par contact dans le contexte plus ample d'adhérence cellulaire a été décrit [11]. Son efficacité semble supérieure au transfert fait par l'intermédiaire des récepteurs.

5. Plusieurs situations expérimentales

pathologiques et physiologiques attestent la faible concentration enzymatique nécessaire pour assurer une vie normale. Un premier exemple est celui des formes atténuées tardives de maladies lysosomiales, compatibles avec la vie jusqu'à l'âge adulte. Ces formes sont associées à une activité enzymatique de 5 % à 10 % de la normale, alors que les formes infantiles ont très sou-

vent un déficit enzymatique total. Une illustration supplémentaire de l'efficacité fonctionnelle d'une faible quantité d'enzymes lysosomiales est le pseudodéficit enzymatique décrit au cours des dernières années pour plusieurs des enzymes lysosomiales et qui consiste en un déficit enzymatique profond, mais incomplet, associé à un état clinique normal (*m/s n° 10, vol. 8, p. 1115*) [8].

Tableau II
 MODÈLES ANIMAUX CONNUS POUR LES MALADIES LYSOSOMALES

Maladie	Espèce animale	Références*
Tay-Sachs	souris ^k	[30] [32]
Sandhoff	chat, souris ^k	[52]
Gaucher	souris ^k	[29]
Krabbe	souris, chien	
Leucodystrophie métachromatique	souris ^k	V. Gieselmann (Communication 10 ^e atelier ESGLD**, 1995)
Landing	chat, chien	
Niemann-Pick C	souris	
Wolman	rat	
Hurler	chat, chien	
Sanfilippo D	chèvre	
Maroteaux-Lamy	rat, chat, souris ^k	C. Peters (Communication 10 ^e atelier ESGLD**, 1995)
Sly	souris, chien	
α-mannosidose	chat, vache	
β-mannosidose	chèvre, mouton, vache	
Fucosidose	chien	
Galactosialidose	chien, souris ^k	A. d'AZZO (Communication 10 ^e atelier ESGLD**, 1995)
Mucopolidose II	souris ^k	[53] [54]
Pompe	caille, vache	
Déficit en activateurs	souris ^k	K. Suzuki (Communication 10 ^e atelier ESGLD**, 1995)

* Seules les références des modèles obtenus par invalidation génique (k : knock-out) sont mentionnées.
 ** European study group on lysosomal diseases.

Possibilités actuelles de traitement des maladies lysosomales

Aucun traitement à visée curative n'existe actuellement. Les trois niveaux pathogéniques auxquels on pourrait intervenir pour instituer un traitement sont (1) les lésions géniques qui déterminent (2) le déficit enzymatique dont la conséquence est (3) l'accumulation du substrat. Dans le cas des maladies lysosomales, il est difficile, voire impossible, d'intervenir pour limiter la quantité de substrat comme cela est fait dans la galactosémie ou la phénylcétonurie, car ces substrats qui s'accumulent ne proviennent pas directement de l'alimentation, et les mécanismes métaboliques qui gouvernent leur synthèse dans l'organisme sont d'une grande complexité. En revanche, il est possible d'intervenir pour corriger le déficit

enzymatique, et depuis une date récente, on envisage l'apport d'un gène normal.

La thérapie enzymatique substitutive: la maladie de Gaucher

Son principe consiste à administrer au malade l'enzyme active dont le déficit est responsable de sa maladie. Les premiers essais de thérapie substitutive effectués entre 1960 et 1970 pour plusieurs maladies lysosomales (maladies de Hurler, Hunter, Tay-Sachs, Fabry, Sanfilippo) n'ont pas donné de résultats convaincants. La déception était en particulier grande dans les maladies affectant le système nerveux central (SNC). Les tentatives de substitution enzymatique ont cependant continué pour les maladies n'impliquant pas le SNC, comme la maladie de Fabry ou la maladie de Gaucher type I.

Les progrès réalisés dans la connaissance de la structure des enzymes lysosomales, ainsi que dans la compréhension des mécanismes de leur transport et de leur transfert d'une cellule à une autre [12], ont abouti à la thérapie substitutive de la maladie de Gaucher, un premier succès dans le domaine [13, 14]. Les lipides non dégradés s'accumulent dans les macrophages, la moelle osseuse, la rate, le foie dans le type I de la maladie, mais aussi dans le SNC dans les types II et III. Pour réaliser la thérapie substitutive de la maladie de Gaucher, la glucocérébrosidase, enzyme déficiente dans cette affection, a été purifiée à partir de placentas humains et modifiée dans sa structure glucidique afin d'exposer les manoses pour faciliter la capture de l'enzyme par les macrophages déficients. L'enzyme modifiée porte le nom d'αglucérase (Cérédase®). Environ 1 500 patients atteints de for-

RÉFÉRENCES

18. Grabowski GA, Bove K, Daughtery C, Prows C. Clinical and pathological outcome of the enzyme therapy in the severe neuroopathic variant of Gaucher disease. Implications for long-term therapy in non-neuroopathic variants. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 17.
19. Hoogerbrugge PM, Suzuki KK, Suzuki KH, Poorthuis BJHM, Kobayashi T, Wagemaker G, van Bekkum DW. Donor-derived cells in the central nervous system of twit-cher mice after bone marrow transplantation. *Science* 1988; 239: 1035-8.
20. Walkley SV, Thrall MA, Dobrenis K, Huang M, March PA, Siegel DA, Wurzlmann S. Bone marrow transplantation corrects the enzyme defect in neurons of the central nervous system in a lysosomal storage disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2970-4.
21. Imaizumi M, Gushi k, Kurobane I, Inoue S, Suzuki J, et al. Long-term effects of bone marrow transplantation for inborn errors of metabolism: a study of four patients with lysosomal storage disease. *Acta Paediatr Jpn* 1994; 36: 30-6.
22. Krivit W, Whitley CB, Chang PN, et al. Lysosomal storage diseases treated by bone marrow transplantation: review of 21 patients. In: Johnson FI, Pochedly C, eds. *Bone marrow transplantation in children*. New York: Raven Press, 1990; 261-87.
23. Hoogerbrugge PM, Brouwer OF, Bordigoni R, Ringden O, Kapaun P, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for lysosomal storage diseases. *Lancet* 1995; 345: 1398-402.
24. Kahn A. *Thérapie génique, l'ADN médicament*. Paris: John Libbey Eurotext, 1993: 135-9.
25. Salomons B, Günzburg WH. Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 129-41.
26. Kozarsky KF, Wilson JM. Gene therapy: adenovirus vectors. *Curr Op Genet Dev* 1993; 3: 499-503.
- me non neurologique de la maladie de Gaucher (type I) sont actuellement traités ainsi dans le monde, avec des doses variables de Cérédate® selon la stratégie. Le traitement semble efficace, tous les patients traités montrant des degrés variables de rémission des symptômes [15-17]. Les résultats sont encore incertains dans les formes neurologiques de la maladie de Gaucher (types II et III) à cause des difficultés à faire bénéficier le SNC de l'enzyme de substitution récupérée essentiellement par les macrophages et dont l'excrétion ultérieure semble minime, sinon nulle. Une trentaine de malades de Gaucher type II sont en cours de traitement et les résultats ne tarderont pas à être communiqués. Pour l'heure, un rapport encourageant concernant un jeune enfant atteint de la maladie de Gaucher (type II), qui avait reçu le traitement dès la naissance et dont la progression de la maladie jusqu'à 11 mois avait été très différente de celle de son frère non traité et décédé à 10 mois [18], n'a finalement pas conduit à un résultat satisfaisant. En résumé, le traitement par substitution enzymatique est efficace pour la maladie de Gaucher type I, non neurologique, mais aucune preuve formelle d'efficacité n'a encore été apportée dans les formes avec atteinte du SNC (types II et III). Tout en étant efficace, ce traitement par Cérédate® a le désavantage d'être d'un prix prohibitif (médicament le plus cher au monde [*Wall Street Journal*, 23 décembre 1991]). L'enzyme recombinante est disponible actuellement et les premiers tests d'efficacité sont en cours avant qu'elle ne soit commercialisée. Très récemment, les recherches de plusieurs équipes en collaboration aux États-Unis (*Children's Hospital of Cincinnati* et *Virginia Polytechnic Institute*, USA) ont abouti à faire surexprimer le gène de la glucocérébrosidase humaine dans la plante de tabac en obtenant 1,6 g d'enzyme native par plante mûre, ce qui permet d'espérer une amélioration considérable du coût du traitement substitutif de la maladie de Gaucher. Les conclusions tirées de cette première thérapeutique substitutive, qui s'est avérée efficace, pourront bénéficier à d'autres maladies lysosomales comme la maladie de Fabry (R. Desnick, New York, USA) ou la maladie de Pompe (A. Reuser, Amsterdam, Pays-Bas), pour lesquelles des thérapeutiques substitutives sont actuellement en cours d'évaluation.

La greffe de moelle osseuse

Par la greffe de moelle osseuse (GMO), on vise à reconstituer le système hématopoïétique d'un malade à l'aide des cellules souches d'un donneur sain et immunocompatible. Les nouvelles cellules sanguines circulantes et les histiocytes qui peuplent les organes deviendront une source d'enzyme à vie. L'enzyme sécrétée dans la circulation pourra être internalisée par endocytose dans des cellules à distance, et des résultats expérimentaux suggèrent que le transfert direct de cellule à cellule est un mécanisme important qui peut contribuer à l'efficacité des GMO dans les maladies lysosomales [12].

Résultats expérimentaux

Les GMO chez les animaux ont montré de manière générale une correction biochimique du déficit enzymatique dans la circulation et dans divers tissus. Plusieurs équipes, dont celle de E.H. Birkenmeier à Bar Harbor (USA), ou celle de G. Wagemaker à Rotterdam (Pays-Bas), en étudiant les effets de la GMO syngénique sur la souris déficiente en β -glucuronidase, modèle de MPS VII, ont pu démontrer une correction biochimique et histologique complète du foie, de la cornée et des glomérules rénaux. La surcharge métabolique était aussi corrigée partiellement dans les méninges et dans les cellules périvasculaires du cerveau, mais ces corrections n'étaient effectives qu'après une haute dose de radiation. Il a également été démontré que l'enzyme apportée par les cellules greffées avait une localisation lysosomale dans les tissus corrigés. En revanche, l'équipe de Patricia L. Chang (Ontario, Canada), en utilisant des tests fonctionnels et de comportement chez des souris MPS VII, a apporté la preuve de l'inefficacité de la GMO sur le SNC, même lorsque l'activité enzymatique a été corrigée. La GMO pratiquée dans les mêmes conditions chez les souris normales en période néonatale a même conduit à la détérioration fonctionnelle de ces animaux, ce qui indique que la GMO peut avoir aussi des conséquences défavorables.

RÉFÉRENCES

27. Wolfe JH, Sands MS, Barker JE, Gwynn B, Rowe LB, Vogler CA, Birkenmeier EH. Reversal of pathology in murine mucopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer. *Nature* 1992; 360: 749-53.
28. Viville S. Recombinaison homologue: nouveaux vecteurs, nouvelles perspectives. *médecine/sciences* 1995; 11: 735-46.
29. Tybulewicz VL, Tremblay ML, La Marca ME, Willemsen R, Stubblefield BK, et al. Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. *Nature* 1992; 357: 407-10.
30. Yamanaka S, Johnson M, Grinberg A, Westphal H, Crawley J, Taniike M, Suzuki K, Proia R. Targeted disruption of the Hexa gene results in mice with biochemical and pathologic features of Tay-Sachs disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9975-9.
31. Dreyfus JC, Akli S, Poenaru L. Maladies de Tay-Sachs et de Sandhoff. Les déficits en β -hexosaminidases, modèles des maladies des lysosomes. *médecine/sciences* 1992; 8: 797-803.
32. Cohen-Tannoudji M, Marchand P, Akli S, Sheardown S, Puech JP, et al. Disruption of murine Hexa gene leads to enzymatic deficiency and to neuronal lysosomal storage, similar to that observed in Tay-Sachs disease. *Mammalian Genome* 1996 (sous presse).
33. Akli S, Caillaud C, Vigne E, Stratford-Perricaudet LD, Poenaru L, Perricaudet M, Kahn A, Peschanski M. Transfer of foreign genes into the brain using adenoviral vectors. *Nature Genet* 1993; 3: 224-8.
34. Le Gal la Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Mallet J. An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 1993; 259: 986-8.
35. Price J, Turner D, Cepko C. Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 156-60.

Des résultats expérimentaux positifs sur le SNC ont été cependant obtenus sur la souris *twitcher*, modèle de la leucodystrophie de Krabbe, maladie essentiellement neurologique (*m/s* n° 6, vol. 4, p. 384). La GMO pratiquée sur ces animaux avait pour résultat de prolonger la survie, d'accroître les concentrations enzymatiques de galactosylcéramidase dans les viscères et dans le SNC, ainsi que de diminuer la surcharge en psychosine, caractéristique de la maladie. Une infiltration du tissu cérébral par des macrophages du donneur a été mise en évidence et considérée comme responsable de la remyélinisation importante du SNC [19]. Une expérience positive a aussi été pratiquée chez le chat atteint d' α -mannosidose chez lequel une compensation histologique post-greffe a été observée [20].

Résultats cliniques

Plusieurs tentatives de GMO à visée thérapeutique ont été faites pour les maladies de Hurler, Hunter, Maroteaux-Lamy, Gaucher, pour la mucopolidose II, la leucodystrophie métaglycémique, etc. Actuellement, environ 200 cas de maladies lysosomales ont reçu une GMO allogénique. Les résultats sont variables. Dans certains cas, l'estimation d'efficacité a déjà été possible, pour d'autres, elle doit être faite à plus long terme pour pouvoir établir les critères indispensables à ce traitement [21].

Les mucopolysaccharidoses

Les mucopolysaccharidoses (MPS), en particulier, ont bénéficié d'améliorations aussi bien biologiques que cliniques [22]. Parmi les soixante-trois malades ainsi traités en Europe [23], onze cas de MPS ont vu leurs signes viscéraux diminuer. L'hépatosplénomégalie, constante dans ces maladies, a disparu. Le foie et la rate sont devenus normaux entre 5 et 12 mois après la GMO chez tous les malades traités. L'hypertrophie cardiaque a disparu chez sept enfants. Les obstructions des voies respiratoires ont également été améliorées graduellement jusqu'à la normalité. Une stabilisation des signes cardiaques a aussi été rapportée dans la mucopolidose II. Les lésions osseuses observées chez ces malades se sont stabilisées; cependant, aucune régression des anomalies squelettiques n'a été

observée. Les cas de MPS avec implication neurologique n'ont pas bénéficié d'améliorations notables, bien que les troubles métaboliques et la surcharge en substrats aient été réduits.

La maladie de Gaucher

Des résultats excellents ont été obtenus dans les GMO effectuées chez cinq malades atteints de forme non neurologique de Gaucher type I, qui ont eu un rétablissement complet [23].

Les leucodystrophies

Plusieurs cas de malades atteints de leucodystrophie métaglycémique, de formes infantile et juvénile, ont reçu une GMO. Malgré l'obtention de concentrations enzymatiques comparables à celles des donneurs, aucune régression des signes n'a été rapportée et, dans la majorité des cas, la maladie a évolué progressivement. La GMO ne semble donc pas être efficace dans les maladies avec signes neurologiques sévères déjà installés, à l'exception du cas publié en 1990 par W. Krivit et al., d'un enfant qui a eu une amélioration neurologique post-GMO.

Concernant la mortalité post-transplant, l'étude européenne des soixante-trois enfants transplantés a montré qu'elle était de 10 % dans les cas ayant reçu une moelle identique dans le système HLA et de 20 % à 25 % si elle provenait de donneurs extérieurs à la famille [23]. Par ailleurs, il faut mentionner le rejet qui est à l'origine de l'insuccès de certaines greffes.

En conclusion

La GMO a donné quelques résultats positifs dans les maladies lysosomales et ces succès peuvent servir au développement d'autres approches thérapeutiques. Cependant, des problèmes et des risques majeurs persistent: la difficulté de trouver un donneur immunocompatible, l'exigence de pratiquer une immunosuppression, l'insuccès de 10 % à 15 % des greffes, la mortalité qui est encore de 10 % à 20 % et le risque existant de la maladie du greffon contre l'hôte. Ces difficultés pourraient, en principe, être contournées par la thérapie génique dont les approches sont différentes puisqu'elle corrige directement le déficit génique.

La thérapie génique

La thérapie génique (TG) peut être définie comme l'utilisation de l'ADN en tant que médicament [24]. Dans le cas d'une maladie génétique, il s'agira le plus souvent d'introduire dans l'organisme atteint la version normale d'un gène défectueux responsable de cette maladie. De multiples voies d'accès et de nombreux vecteurs géniques ont été, ou sont actuellement, à l'étude (*m/s n°2, vol. 9, p. 219*) [24-26]. Seule la thérapie génique somatique, sans effet sur la descendance des malades, sera traitée ici.

Dans le cadre des maladies lysosomales, deux stratégies sont à considérer, éventuellement complémentaires: (1) le transfert du gène thérapeutique dans les cellules des organes les plus atteints, car il importe de leur assurer un taux enzymatique maximal. Nous savons, en effet, que ces affections sont susceptibles de toucher plus ou moins tous les tissus, il pourra donc être difficile de corriger un très grand pourcentage de cellules dans de nombreux tissus; (2) la production périphérique et l'excrétion de l'enzyme dans le milieu extracellulaire, la circulation sanguine ou le liquide céphalo-rachidien, afin d'établir une concentration homéostatique régulière et de permettre une plus large distribution aux cellules déficientes. Par le phénomène de recapture, l'enzyme pourra être internalisée par des tissus à distance.

Tester l'un ou l'autre de ces procédés complexes, ainsi que d'autres alternatives de thérapie génique, nécessite l'utilisation de modèles animaux pour vérifier leur efficacité et leur innocuité, bien que l'extrapolation de l'animal à l'homme ne soit jamais possible en totalité. Un bon modèle animal pour la thérapie génique est celui qui reproduit le plus fidèlement possible une maladie humaine du point de vue biologique et clinique, qui permet facilement de constater l'aggravation ou l'amélioration de ses symptômes et qui est facilement utilisable en laboratoire.

En ce qui concerne les maladies lysosomales, des modèles naturels ont été retrouvés dans différentes espèces animales. L'exemple le plus typique et le plus utilisé dans la mise au point d'une thérapie génique est celui de

la maladie de Sly (MPS VII) chez la souris [27]. Une vingtaine de déficits en enzymes lysosomales ont été décrits dans les espèces animales les plus diverses (*Tableau II*). Certaines maladies ont été trouvées chez un seul animal et la lignée n'a pas pu être conservée. Parfois, elles existent dans des espèces comme les bovins, difficiles à utiliser comme modèle de thérapie génique pour d'évidentes raisons pratiques et économiques.

Plusieurs équipes dans le monde travaillent à l'obtention de modèles animaux des maladies lysosomales par invalidation génique. Il s'agit de créer un déficit enzymatique artificiel en provoquant, par recombinaison homologue, l'interruption du gène avec la perte totale de sa fonction [28]. L'anomalie ainsi créée devient héréditaire. L'expression clinique du modèle obtenu est imprévisible. C'est ainsi que le modèle obtenu chez la souris pour la maladie de Gaucher meurt dans les premiers jours après la naissance [29], alors que les modèles obtenus pour la maladie de Tay-Sachs [30, 31] et pour la leucodystrophie métachromatique font intervenir des mécanismes métaboliques compensatoires inexistant chez l'homme et ne manifestent pas une symptomatologie clinique évidente. Ils présentent cependant des signes anatomo-pathologiques ou des anomalies de comportement permettant de juger d'une éventuelle efficacité thérapeutique. Dernièrement ont été obtenus les modèles de déficit en prosaposine (SAP, activateur protéique des sphingolipides), impliqué dans plusieurs maladies lysosomales, de déficit en protéine protectrice, responsable de la galactosialidose (*m/s n°10, vol. 4, p. 655*), ainsi que celui de déficit en hexosaminidase B, responsable de la maladie de Sandhoff, qui reproduisent, en revanche, les maladies humaines correspondantes [31].

Résultats expérimentaux de thérapie génique dans les maladies lysosomales

Voies d'abord des différents tissus cibles

Une importante série de recherches a été accomplie dans le but de

RÉFÉRENCES

36. Wolfe JH, Deshmane SL, Fraser NW. Herpes virus vector gene transfer and expression of β -glucuronidase in the central nervous system of MPS VII mice. *Nature Genet* 1992; 1: 379-84.
37. Roessler BJ, Davidson BL. Direct plasmid mediated transfection of adult murine brain cells *in vivo* using cationic liposomes. *Neurosci Lett* 1994; 167: 5-10.
38. Draghia R, Caillaud C, Manicom R, Pavirani A, Kahn A, Poenaru L. Gene delivery into the central nervous system by nasal instillation in rats. *Gene Ther* 1995; 2: 418-23.
39. Krall WJ, Challita PM, Permuter LS, Skelton DC, Kahn DB. Cells expressing human glucocerebrosidase from a retroviral vector repopulate macrophages and central nervous system microglia after murine bone marrow transplantation. *Blood* 1994; 83: 2737-48.
40. Grossman M, Raper SE, Kozarsky *et al*. Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nature Genet* 1994; 6: 335-41.
41. Nabel EG. Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* 1995; 91: 541-8.
42. Finkel T, Epstein S. Gene therapy for vascular disease. *FASEB J* 1995; 9: 843-51.
43. Riley DJ, Lee WH. The potential of gene therapy for treatment of kidney diseases. *Semin Nephrol* 1995; 15: 57-69.
44. Jaffe HA, Danel C, Longenecker G, Metzger M, Setoguchi Y, *et al*. Adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer and expression in normal rat liver. *Nature Genet* 1992; 1: 372-8.
45. Stratford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M, Briand P. Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscle and heart. *J Clin Invest* 1992; 90: 626-30.

RÉFÉRENCES

46. Moullier P, Bohl D, Heard JM, Danos O. Correction of lysosomal storage in the liver and spleen of MPS VII mice by implantation of genetically-modified skin fibroblasts. *Nature Genet* 1993; 4: 154-9.
47. Danos O, Moullier P, Heard JM. Réimplantation de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organs vascularisés. *médecine/sciences* 1993; 9: 208-10.
48. Xu L, Stahl SK, Dave HPG, Schiffmann R, Correll P, Kessler S, Karlsson S. Correction of the enzyme deficiency in hematopoietic cells of Gaucher patients using a clinically acceptable retroviral supernatant transduction protocol. *Exp Hematol* 1994; 22: 223-30.
49. Nimgaonkar MT, Bahnson AB, Boggs SS, Ball ED, Barranger JA. Transduction of mobilized peripheral blood CD34⁺ cells with the glucocerebrosidase cDNA. *Gene Ther* 1994; 1: 201-7.
50. Hatzfeld J, Panterne B, Sansilvestri P, Batard P, Lévesque J, Cardoso A, Li M, Ginsbourg M, Zhou Y, Hatzfeld A. La cellule souche hématopoïétique humaine: du mythe à la réalité. *médecine/sciences* 1993; 9: 1110-2.
51. Gilgenkrantz H. L'infection intrathymique néonatale d'adénovirus recombinant: une voie de tolérisation. *médecine/sciences* 1995; 11: 1371-2.
52. Sango K, Yamanaka S, Hoffmann A, Okuda Y, Grinberg A *et al.* Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nature Genet* 1995; 11: 170-6.
53. Köster A, Saftig P, Matzner U, von Figura K, Peters C, Pohlmann R. Targeted disruption of the Mr 46 000 mannose 6-phosphate receptor gene in mice results in misrouting of lysosomal proteins. *EMBO J* 1993; 12: 5219-23.
54. Ludwig T, Ovitt CE, Bauer U, Hollinshead M, Remmler J, Lobel P, Rüther U, Hoflack B. Targeted disruption of the mouse cation-dependent mannose 6-phosphate receptor results in partial missorting of multiple lysosomal enzymes. *EMBO J* 1993; 12: 5225-35.
- démontrer la possibilité de transferts ciblés de gènes pour atteindre spécifiquement un organe. La majorité de ces expériences ont été effectuées avec des vecteurs divers contenant un gène rapporteur non spécifique, très souvent celui codant pour la β -galactosidase d'*Escherichia coli* avec un ciblage nucléaire (nls-LacZ) pour la facilité qu'il confère à mettre en évidence son expression par simple coloration et à apprécier le nombre de cellules infectées. Les résultats de ces expériences ont en principe une validité générale et seront applicables à plusieurs maladies impliquant l'organe respectif.
- Le transfert de gènes dans le SNC a été démontré par plusieurs méthodes: le transfert direct à l'aide de vecteurs viraux défectueux: adénovirus [33, 34], rétrovirus [35], virus de l'herpès [36] ou à l'aide de liposomes [37].
- Dans notre laboratoire, Catherine Caillaud et Saïd Akli ont montré que 100 % des cellules neuronales et gliales en culture primaire, infectées par l'adénovirus recombinant porteur du gène *lacZ* (Ad-LacZ), synthétisent la β -galactosidase sans effet cytopathique. Plusieurs équipes dont la nôtre ont également montré que ce même adénovirus recombinant injecté *in vivo* chez le rat par voie stéréotaxique dans différents noyaux ou structures cérébrales ou dans les ventricules peut infecter aussi bien les neurones que les cellules gliales (astrocytes, microglie, cellules épendymaires). L'expression du gène est très forte et précoce et persiste au moins deux mois. Le vecteur est capté par les terminaisons nerveuses, transporté de façon rétrograde et commande la synthèse de β -galactosidase dans des cellules à distance. Ce dernier résultat nous a déterminés à expérimenter d'autres voies d'accès au cerveau. Nous avons ainsi obtenu des résultats positifs par instillation nasale du vecteur adénoviral et démontré que le transfert génique dans le cerveau est possible par cette voie, mais à un faible degré [38]. Par ailleurs, les expériences de transplantation intracérébrale de cellules neuronales embryonnaires normales, ou de fibroblastes génétiquement corrigés, ainsi que les autogreffes de moelle osseuse génétiquement corrigées *ex vivo* [39] attestent la possibilité d'un transfert indirect de gène dans le cerveau qui pourrait se révéler intéressant dans le traitement des maladies lysosomales avec atteinte du SNC.
- En outre, de nombreuses tentatives de transfert de gène ont été faites dans le foie [40], le cœur [41], les cellules vasculaires [42], le rein [43], etc. avec des résultats encourageants, mais une expression transitoire du transgène. En effet, la synthèse par le foie ou le muscle d'une protéine thérapeutique distribuée dans l'organisme et exerçant son effet à distance pourrait se révéler efficace dans les maladies lysosomales. Le ciblage hépatique d'un transgène a été obtenu après des expériences utilisant différentes voies d'administration. L'injection directe d'un Ad-Lac Z dans la veine porte [44], mais aussi dans la circulation générale chez le rat, conduit à l'expression du transgène dans le foie, principalement dans les hépatocytes. Le rat *Gunn*, atteint d'un défaut de conjugaison de la bilirubine, a été un excellent modèle pour démontrer la possibilité de ciblage génique dans le foie aussi bien pour la correction d'une fonction tissulaire spécifique que pour la sécrétion d'une protéine thérapeutique applicable aux maladies lysosomales. L'utilisation de la stratégie indirecte de cellules infectées *in vitro* avec le même vecteur, puis implantées dans la rate (résultats personnels), a également démontré la possibilité de transfert génique dans le foie.
- Le muscle constitue un tissu favorable à l'expression périphérique d'un transgène dans la stratégie envisagée pour les maladies lysosomales. L'injection intraveineuse chez la souris d'un adénovirus recombinant a permis le transfert à long terme dans le muscle et dans le cœur [45]. Plus récemment, Philippe Moullier, à l'Institut Pasteur de Paris (France), a démontré la faisabilité d'un transfert de gène efficace dans les cellules tubulaires par perfusion d'un Ad-LacZ dans l'artère rénale du rat, et L. Lay *et al.*, à l'Université d'Arizona (USA), ont obtenu un transfert efficace de gène dans les glomérules rénaux par injection pelvienne intrarénale de liposomes-LacZ persistant un mois après l'injection.

Tableau III

PROTOCOLES CLINIQUES DE THÉRAPIE GÉNIQUE DES MALADIES LYSOSOMALES AUTORISÉS
OU COMMENCÉS AU 1^{ER} OCTOBRE 1994

Maladie	Transgène	Vecteur	Protocole	Investigateur(s)	Industriel
Gaucher	Glucocérébrosidase	Rétrovirus	<i>Ex vivo</i> , cellules souches hématopoïétiques autologues	S. Karlsson, C. Dunbar et D.B. Kohn <i>National Institute of Neurologic Disorders and Stroke, National Heart, Lung and Blood Institute, Children's Hospital, Los Angeles, USA</i>	<i>Genetic Therapy Inc.</i>
Gaucher	Glucocérébrosidase	Rétrovirus	<i>Ex vivo</i> , cellules souches circulantes	F. Schuening <i>Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA</i>	<i>Targeted Genetics corps</i>
Gaucher	Glucocérébrosidase	Rétrovirus	<i>Ex vivo</i> , cellules souches hématopoïétiques CD34 ⁺ , 5 patients	J. Barranger et P. Robbins <i>University of Pittsburgh, USA</i>	<i>Theragen Inc.</i>
Hunter	Iduronate-2-sulfatase	Rétrovirus	<i>Ex vivo</i> , cellules souches circulantes 2 adultes + 2 enfants, injections répétées	C.B. Whitley <i>University of Minnesota Hospital and Clinic, USA</i>	X
Hurler	α -L-iduronidase	Rétrovirus	<i>In vivo</i> , organoïdes, voie intrapéritonéale 6 patients	J.M. Heard et A. Fischer Institut Pasteur et Hôpital Necker (France) Inserm U. 132 et Centre Hôpital Lyon-Sud (France)	X

X: pas d'industriel identifié.

Expression *ex vivo* de transgènes spécifiques des maladies lysosomales dans des cellules de patients

Une des étapes préliminaires essentielles pour une thérapie génique est le contrôle de l'expression du gène « correcteur » transféré en culture dans les cellules déficientes provenant de malades. Plusieurs des gènes humains impliqués dans les maladies lysosomales, portés par des vecteurs recombinants différents, ont démontré une bonne expression ou une surexpression cellulaire significative, et la littérature est très abondante en ce sens.

Pour ne citer que quelques exemples, l'utilisation d'un vecteur rétroviral sous le contrôle des séquences SV40 pour les gènes codant pour la glucocérébro-

sidase, la stéroïde sulfatase, ou l'iduronate-2-sulfatase a été accompagnée d'une expression de 2 à 50 fois supérieure à celle des cellules non transférées. Un rétrovirus avec le promoteur CMV (cytomégalovirus) a surexprimé les gènes codant pour l' α -fucosidase ou l' α -L-iduronidase (150 à 270 fois la normale). Un vecteur AAV (*adeno-associated virus*) avec un promoteur et un *enhancer* du virus SV40 a permis une excellente expression des gènes de l'arylsulfatase A. Différents vecteurs rétroviraux porteurs de l'ADNc de l' α -iduronidase, introduits dans les cellules PA317, exprimaient l'enzyme 800 à 1200 fois plus que les cellules témoins.

Dans notre laboratoire, en utilisant un vecteur recombinant adénoviral (Ad. RSV) pour le gène codant pour l'hexosaminidase A, Saïd Akli a

obtenu sa surexpression dans des fibroblastes de malades atteints de la maladie de Tay-Sachs (5 fois la normale) et a montré une importante excrétion de l'enzyme dans le milieu de culture (25 fois la normale), élément important pour les perspectives thérapeutiques de cette affection.

La correction expérimentale *in vivo* par thérapie génique

L'existence d'un modèle murin naturel de MPS VII, la maladie de Sly humaine, a permis à plusieurs équipes d'avancer dans la méthodologie de thérapie génique. Plusieurs protocoles ont été proposés [28, 46]. A l'Institut Pasteur de Paris (France), l'équipe d'Olivier Danos et Jean-Michel Heard

a obtenu des résultats remarquables en utilisant des implants de cellules génétiquement modifiées pour obtenir une sécrétion enzymatique *in vivo*. Un vecteur rétroviral contenant l'ADNc humain de la β -glucuronidase a servi à transférer le gène dans des fibroblastes cutanés, des cellules de moelle osseuse et des myoblastes qui ont été ensuite réimplantés chez la souris MPS VII. Les fibroblastes, corrigés *ex vivo*, introduits dans un gel de collagène en présence de fibres synthétiques et de facteurs de croissance, ont servi à constituer un « organoïde » [47]. Implanté dans la cavité péritonéale de l'animal, ce néo-organe est vascularisé au bout de quelques jours et devient un implant autonome relié à la circulation mésentérique. Chez les animaux ayant reçu l'organoïde, la β -glucuronidase était synthétisée et sécrétée jusqu'à 150 jours après l'implantation. Une activité enzymatique notable a été retrouvée dans plusieurs organes : foie, rate, poumons, cerveau, cœur et moelle osseuse. Les taux d'enzyme captée à distance par ces tissus étaient de 0,5 % à 3 % de la normale. Les signes de surcharge lysosomale typiques de la maladie ont disparu dans le foie et la rate [46]. Des résultats positifs ont également été obtenus par cette méthode chez le chien.

Des cellules hématopoïétiques traitées ont, dans le même laboratoire, été greffées chez l'animal irradié. Seules 5 % des cellules hématopoïétiques avaient intégré le vecteur mais l'enzyme fabriquée, retrouvée dans la rate, la moelle osseuse, les ganglions, le foie, les poumons et le cerveau pendant au minimum cinq mois, a permis d'obtenir une nette réduction de la surcharge. Une autre approche de thérapie génique, utilisée chez la souris MPS VII, a été celle des myoblastes génétiquement modifiés, transplantés dans les muscles, préalablement lésés, de la souris. Les muscles étant ainsi en régénération exprimaient la β -glucuronidase dans 50 % des fibres et sécrétaient de l'enzyme qui pouvait être mise en évidence dans le foie un mois après transfert. Certaines de ces expériences sont actuellement réalisées chez des animaux de plus grande taille, plus représentatifs des problèmes qui seront rencontrés chez l'homme. Mais, comme nous l'avons

mentionné précédemment, l'amélioration des signes pathologiques obtenue avec de faibles quantités d'enzyme est tout à fait encourageante. D'autres vecteurs recombinants spécifiques sont en cours d'étude pour la correction des MPS (maladies de Hurler, de Maroteaux-Lamy, de Hunter).

Protocoles de thérapie génique des maladies lysosomales chez l'homme

Plusieurs protocoles cliniques de thérapie génique de maladies lysosomales ont obtenu, ou sont en voie d'obtenir, l'autorisation d'être appliqués chez l'homme (Tableau III).

La maladie de Gaucher

Le clonage du gène humain codant pour la glucocérébrosidase (GC), les bénéfices cliniques obtenus après les greffes allogéniques de moelle osseuse, les résultats positifs obtenus dans la maladie de Gaucher par la thérapie substitutive et la découverte du rôle essentiel joué par les macrophages dans cette affection ont fait d'elle un candidat prioritaire pour une thérapie génique.

Plusieurs stratégies ont été proposées, ciblées sur la lignée macrophagique. Depuis 1992, l'équipe de John Barranger (Pittsburgh, PA, USA) a utilisé un vecteur recombinant rétroviral pour transférer le gène codant pour la GC dans les cellules souches hématopoïétiques de souris, avec une expression persistant plusieurs mois. D'autres équipes, au *Children's Hospital* de Los Angeles, ont démontré que trois mois après la greffe de cellules hématopoïétiques corrigées chez la souris, le foie, les poumons, le cerveau et la moelle épinière étaient repeuplés par les cellules greffées et que celles-ci exprimaient la GC quatre mois après la greffe. Dans le cerveau, les cellules greffées représentaient 20 % des cellules macrophagiques (périvasculaires ou microgliales) [39]. Ce résultat suggère une fois de plus que des maladies lysosomales neurologiques pourraient aussi bénéficier de la thérapie génique. Plus récemment, il a été démontré que le transfert était également efficace dans des cellules médullaires humaines en culture prolongée [48, 49]. Les cel-

lules CD34⁺ contenant des cellules hématopoïétiques souches ont pu être enrichies 10 fois par des méthodes d'immunoabsorption à partir de moelle osseuse, de sang périphérique ou de sang du cordon. Selon les auteurs, 30 % à 50 % des cellules souches ont pu être infectées *in vitro* par coculture avec des cellules productrices de vecteur rétroviral recombiné ; l'activité glucocérébrosidase, 2 à 3 fois supérieure à celle des cellules non infectées, était maintenue jusqu'à trois semaines. Les cellules hématopoïétiques de malades atteints de maladie de Gaucher ont également été efficacement infectées et le déficit en GC a été corrigé dans les cellules souches en culture. En juin 1993, le RAC (*recombinant DNA advisory committee, USA*) a donné son accord pour l'application clinique à quinze malades, dans trois hôpitaux différents (Tableau III), du protocole utilisant un vecteur rétroviral pour transférer *ex vivo* le gène de la GC dans les cellules souches hématopoïétiques qui, différenciées notamment en macrophages, pourront agir efficacement dans divers tissus.

La maladie de Hurler

A Paris (France), l'équipe d'Alain Fischer à l'hôpital Necker-Enfants Malades et celle de Jean-Michel Heard à l'Institut Pasteur, ont proposé un protocole clinique de thérapie génique de la maladie de Hurler chez l'homme, par implantation de fibroblastes infectés *ex vivo* à l'aide d'un rétrovirus véhiculant l'ADNc codant pour l' α -iduronidase, enzyme déficiente dans cette maladie. L'approche sera celle d'un organoïde créé *in vitro* et implanté en intrapéritonéal. Ce protocole prévu pour 6 malades est actuellement examiné par les instances responsables en France.

La maladie de Hunter

Particulière par sa transmission liée au chromosome X, elle fait l'objet d'un protocole clinique émanant de l'université du Minnesota (USA) et consistant dans la transduction *ex vivo* des cellules souches circulantes par un vecteur rétroviral portant le gène de l'iduronate-2-sulfatase. Deux adultes et deux enfants sont prévus pour recevoir des perfusions répétées de cellules corrigées.

Avantages et limites potentiels de la thérapie génique

Appliquée aux maladies monogéniques, dont font partie les maladies lysosomales, la thérapie génique, si son efficacité est prouvée, présentera par rapport aux autres méthodes de traitement certains avantages : (1) par rapport à la greffe de moelle, elle ne nécessite pas la recherche aléatoire d'un donneur HLA compatible. De même, elle ne soumet pas le patient au risque de la maladie du greffon contre l'hôte ; (2) elle est aussi plus avantageuse que la thérapie substitutive qui est excessivement chère à l'heure actuelle, qui doit être pratiquée fréquemment et à vie, et qui, de plus, si elle est efficace, ne permet cependant pas la guérison du malade ; (3) l'utilisation pour les autogreffes de cellules souches enrichies donne à l'approche de la thérapie génique par voie indirecte une chance supplémentaire. S'il était possible de multiplier *in vitro* les cellules souches hématopoïétiques [50], cela pourrait permettre d'augmenter le nombre de cellules autogreffées après leur modification génique en culture.

Cependant, le pourcentage des cellules souches hématopoïétiques infectées, et exprimant de manière stable le transgène thérapeutique, reste aujourd'hui faible, surtout chez les gros mammifères.

L'expression à long terme des gènes correcteurs dans l'organisme traité reste en tout état de cause un point clé d'une thérapie génique efficace, non résolu aujourd'hui.

Un autre problème est celui des possibles réactions immunologiques de l'organisme traité : (1) vis-à-vis du vecteur utilisé, en particulier de l'adénovirus [26] dans les constructions de vecteurs de la première génération dans lesquelles la synthèse des protéines propres au virus n'est pas totalement abolie ; (2) vis-à-vis de l'enzyme synthétisée sous le contrôle du gène thérapeutique, surtout dans les cas où le déficit enzymatique est total et où la protéine correctrice peut être « vue » par l'organisme comme une protéine étrangère. De nouvelles

générations de vecteurs sont déjà obtenues mais le recul n'est pas encore suffisant pour juger de leur efficacité et de leur innocuité.

Parmi ces nouveaux vecteurs, on peut mentionner celui obtenu par l'équipe de C.T. Caskey (Houston, USA), utilisant la stratégie d'un virus auxiliaire. Il s'agit d'un vecteur adénoviral dépourvu de toutes ses séquences codantes qui sont remplacées par un transgène dont la taille peut atteindre 30 kb. Ce type de vecteur a également pu être obtenu en utilisant la stratégie des cellules transcomplémentantes contenant, dans leur génome, en dehors du gène E_1 du virus, le gène codant pour sa propre polymérase qui est un gène E_2 . De plus, l'utilisation comme vecteurs du virus AAV (*adeno-associated-virus*) ou du virus Sindbis, qui a la capacité d'autoamplification, apporteront peut-être d'autres avantages à la thérapie génique.

L'ensemble de ces avancées, ainsi que les résultats obtenus par l'injection intrathymique d'adénovirus recombinant, qui induit chez l'animal une tolérance et une expression prolongée du transgène [51], permettent ainsi de manifester une certaine confiance dans les perspectives, au moins à long terme, de la thérapie génique des maladies lysosomales.

Conclusion

Les succès obtenus dans la thérapie génique de modèles animaux des maladies lysosomales permettent de fonder un espoir d'application chez l'homme sans qu'il soit possible de méconnaître les difficultés restant à surmonter.

Les maladies lysosomales sont des affections d'une extraordinaire hétérogénéité si bien que les problèmes à résoudre seront de nature différente selon les cas et qu'il est aujourd'hui difficile de préjuger de ce que seront les méthodes les plus probablement efficaces dans le futur.

Le statut de ces maladies, dont la plupart restent aujourd'hui sans traitement efficace, justifie sans nul doute les efforts déployés par plusieurs équipes, dont la nôtre, dans la mise au point de thérapies géniques ■

Remerciements

Je remercie Axel Kahn pour ses critiques constructives et ses suggestions, Catherine Caillaud pour les nombreuses discussions qui m'ont facilité la conception de ce manuscrit et Aurélie Ajroldi pour m'avoir aidée à sa préparation.

Nous remercions également l'Association VML (Vaincre les Maladies Lysosomales) pour leur soutien.

Summary

Gene therapy for lysosomal storage diseases

Lysosomal storage diseases (LSD) are monogenic disorders resulting from the deficiency in intralysosomal enzymes involved in macromolecules catabolism. The clinical severity and the absence of an efficient therapy for the majority of the LSD justify the various approaches for gene therapy now in progress. Most of the genes encoding the normal lysosomal enzymes have been cloned and the size of the corresponding cDNAs is generally compatible with the transfer by recombinant vectors. Different gene therapy strategies are now evaluated in animal models and clinical protocols for application in patients are in prospect. Many problems remain and they need to be solved before concluding on the validity of this approach.

TIRÉS À PART

L. Poenaru.