

les acides aminés impliqués dans ces interactions aiderait considérablement à trouver de nouvelles stratégies capables de fluidifier un mucus anormal comme celui que l'on retrouve dans la mucoviscidose et dans d'autres affections pulmonaires obstructives chroniques. Cependant, ces études dépendent principalement de la disponibilité de molécules recombinantes, constituées d'une ou plusieurs copies du domaine CYS, et produites par des méthodes de culture cellulaire, ce qui semble encore aujourd'hui particulièrement difficile à obtenir [13]. ♦

Custom modification *in vivo* of mucus properties: proof of concept and potential applications

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Gouyer V, Gottrand F, Desseyn JL. The extraordinarily complex but highly structured organization of intestinal mucus-gel unveiled in multicolor images. *PLoS One* 2011; 6 : e18761.
- Johansson ME, Hansson GC. Microbiology. Keeping bacteria at a distance. *Science* 2011; 334 : 182-3.
- Zouiten-Mekki L, Serghini M, Fekih M, et al. Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Med Sci (Paris)* 2013; 29 : 1145-50.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, et al. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* 2007; 56 : 343-50.
- Ridley C, Kouvatsos N, Raynal BD, et al. Assembly of the respiratory mucin MUC5B: a new model for a gel-forming mucin. *J Biol Chem* 2014; 289 : 16409-20.
- Johansson ME, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10 : 352-61.
- Bansil R and Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr Opin Colloid Interface* 2006; 11 : 164-70.
- Gouyer V, Dubuquoy L, Robbe-Masselot C, et al. Delivery of a mucin domain enriched in cysteine residues strengthens the intestinal mucous barrier. *Sci Rep* 2015; 5 : 9577.
- Desseyn JL. Mucin CYS domains are ancient and highly conserved modules that evolved in concert. *Mol Phylogenet Evol* 2009; 52 : 284-92.
- Borges S, Silva J, Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 289 : 479-89.
- Brunelli R, Papi M, Arcovito G, et al. Globular structure of human ovulatory cervical mucus. *FASEB J* 2007; 21 : 3872-6.
- Perez-Vilar J and Boucher RC. Reevaluating gel-forming mucins' roles in cystic fibrosis lung disease. *Free Radic Biol Med* 2004; 37 : 1564-77.
- Bäckström M, Ambort D, Thomsson E, et al. Increased understanding of the biochemistry and biosynthesis of MUC2 and other gel-forming mucins through the recombinant expression of their protein domains. *Mol Biotechnol* 2013; 54 : 250-6.

NOUVELLE

Effacité et sécurité du traitement par thérapie génique des patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich

Anne Galy^{1,2}, Guillaume Corre^{1,2}, Marina Cavazzana³⁻⁵, Salima Hacein-Bey-Abina^{3,4,6,7}

> Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) est un déficit immunitaire primaire rare faisant l'objet de plusieurs essais de thérapie génique dans différents pays. L'essai de thérapie génique publié récemment et réalisé à Paris et à Londres, présente la particularité d'avoir montré une efficacité thérapeutique sur une population de patients pédiatriques relativement âgés et sévèrement atteints [1]. L'approche par transfert de gène à l'aide d'un vecteur lentiviral dans les cellules souches hématopoïétiques autologues s'est révélée robuste et dénuée d'effets secondaires liés au vecteur « self-inactivé » (ou

self inactivating [SIN] ; les promoteurs viraux sont modifiés pour éviter le risque lié à la dérégulation de gènes adjacents) qui a été utilisé. Alors que les études se poursuivent sur un plus grand nombre de patients et dans d'autres centres, la thérapie génique pourrait désormais être considérée comme un futur traitement alternatif à la greffe allogénique de cellules souches chez les patients WAS ne pouvant pas bénéficier d'un donneur HLA-compatible. La maladie WAS est bien caractérisée. Ce déficit immunitaire primaire lié à l'X est causé par l'absence de la protéine WASp (*Wiskott Aldrich syndrome protein*) dans

¹Généthon, unité mixte de recherche Integrare UMR S951, 1bis, rue de l'Internationale, F-91000 Évry, France ; ²Inserm UMR S951 ; université d'Évry Val d'Essonne ; EPHE ; Généthon, 1bis, rue de l'Internationale, F-91000 Évry, France ; ³Département de biothérapies, hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France ; ⁴CIC biothérapies, groupe hospitalier universitaire Ouest, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Inserm, Paris, France ; ⁵Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité Université, Institut Imagine, Paris, France ; ⁶UTCBS CNRS 8258-Inserm U1022, Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, université Paris Descartes, Paris, France ; ⁷Service d'Immunologie Biologique, Groupe Hospitalier Universitaire Paris-Sud, Le-Kremlin-Bicêtre, France. galy@genethon.fr salima.hacein-bey@aphp.fr

les cellules sanguines. Dans sa forme classique, les patients souffrent d'infections bactériennes et virales récurrentes, d'eczéma sévère, de saignements allant jusqu'aux hémorragies et certains développent des manifestations



Patient	Âge (ans)	Score clinique		Saignements		Eczéma		Infections		Auto-immunité	
		PréTG	PostTG	PréTG	PostTG	PréTG	PostTG	PréTG	PostTG	PréTG	PostTG
1	10	5	<1	M	A	S	A	S	A	M	A
2	15.5	5	5	S	A	S	M	S	A	S	M
4	0.8	5	<1	S	M	M	A	M	A	S	A
5	3	5	<1	S	M	S	A	M	M	S	A
6	7	3	<1	M	M	S	A	S	A	A	A
7	3.5	5	1	S	M	S	A	M	A	S	A

Tableau I. Démographie des patients WAS et évolution des signes cliniques. Six des 7 patients WAS traités par thérapie génique à Paris et Londres et décrits dans [1] sont reportés. Leurs signes cliniques sont classés en S : Sévère, M : Modéré, A : Aucun, dans la période précédant la thérapie génique (PréTG) ou après infusion des cellules transduites (PostTG) et jusqu'au dernier point de temps analysé. Le patient 3 n'a pas pu être évalué sur une durée suffisante et n'est pas inclus dans ce tableau. Le score clinique utilisé pour évaluer la sévérité de la maladie WAS est défini de la façon suivante : un score 1 correspond à la microthrombocytopenie retrouvée chez tous les patients ; un score 2 inclut un eczéma modéré, des critères d'immunodéficience et des infections modérées occasionnelles ; un score de 3 représente une immunodéficience plus sévère, associée à des infections prolongées ; un score de 4 est attribué en cas d'eczéma ou d'infections persistantes et résistantes aux traitements conventionnels ; le score 5 concerne les formes cliniques très sévères ou incluant des complications autoimmunes ou malignes.

auto-immunes ou lympho-prolifératives [2]. La protéine WASp est un régulateur du cytosquelette d'actine et de la signalisation cellulaire dans les leucocytes. Son absence perturbe de multiples fonctions immunitaires et provoque une thrombopénie microcytaire caractéristique [3]. La maladie est très rare (1 cas sur 250 000 naissances) et le traitement de référence est la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogéniques dont le risque de complications reste élevé lorsqu'un donneur HLA-compatible (10/10 ou 9/10)¹ n'est pas disponible [4].

La thérapie génique autologue a donc été évaluée comme une alternative potentielle chez certains patients WAS. L'approche repose sur le transfert de gène *ex vivo* dans les CSH du patient ; cette approche thérapeutique a déjà montré son efficacité dans un certain nombre de maladies du système lympho-hématopoïétique [5]. Toutefois, la qualité et la sécurité des vecteurs de transfert de gène font toujours l'objet de stratégies

d'optimisation, notamment en raison des complications possibles liées à la mutagenèse insertionnelle, comme cela a été observé dans certains essais [6]. Un essai multicentrique de phase I/II a été mené à Londres (Great Ormond Street Hospital) et à Paris (Hôpital Necker-Enfants Malades), dont Généthon est promoteur. Cet essai est basé sur l'utilisation d'un vecteur lentiviral sécurisé pour traiter des patients WAS sévèrement atteints ne disposant pas de donneur HLA-compatible. La faisabilité et la sécurité de ce vecteur ont été évaluées chez 7 patients inclus de façon séquentielle sur une période de 4 ans. Le vecteur testé est dérivé du VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine-1) et contient l'ADN complémentaire du gène *WAS* humain, exprimé grâce à un fragment du promoteur proximal de ce gène, permettant une expression physiologique du transgène dans les cellules hématopoïétiques [7]. La cassette d'expression est dépourvue de séquences virales codantes. En particulier, les régions LTR (*long-terminal repeats*) ont été modifiées pour supprimer les sites de liaison aux facteurs de transcription produisant ainsi un vecteur self-inactivé (vecteur SIN) devenu incapable de se

répliquer et d'induire, à travers ses LTR, la transactivation de gènes adjacents à son insertion génomique [8]. Le vecteur est utilisé pour transduire les cellules CD34⁺ du patient *ex vivo*. L'infusion au patient des CSH ainsi transduites est précédée par un conditionnement myéloablatif³ et lymphodéplétant à l'aide de busulfan et de fludarabine. Les patients sont alors suivis dans l'essai pendant une première période de 2 ans. Une étude de suivi est ensuite réalisée pendant 3 ans.

Les premiers résultats de cet essai ont été publiés récemment et décrivent l'évolution de six patients sur sept, qui ont été suivis sur une durée allant de 9 à 42 mois [1]. Un des sept patients est décédé 7 mois après la thérapie génique à la suite de complications liées à des infections virales pré-existantes. Les six patients évaluables avaient un score élevé de sévérité de la maladie au moment de l'inclusion dans l'essai (score supérieur ou égal à 3, voir les définitions dans la légende du Tableau I). Après traitement, leur score s'est trouvé réduit au plus

¹ Score de compatibilité entre les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, HLA en anglais) du donneur et du receveur de la greffe.

² Le CD34 est exprimé par tous les progéniteurs hématopoïétiques.

³ Le conditionnement myéloablatif aboutit à l'élimination des cellules myéloïdes du patient ainsi conditionné.

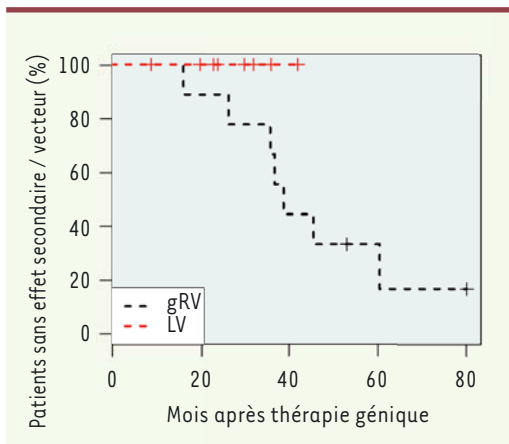


Figure 1. Apparition d'effets secondaires liés au vecteur, estimés par la méthode de Kaplan-Meier⁴. Ces courbes montrent l'évolution de la proportion de patients sans effets secondaires liés au vecteur dans les essais de thérapie génique de WAS qui ont été publiés et qui utilisent un vecteur lentiviral (LV) à Paris, Londres [1] et à Milan [9] (courbe rouge) et un vecteur gamma rétroviral (gRV) à Hanovre [10] (courbe noire). Les effets secondaires liés au vecteur dans l'essai gRV sont l'apparition de T-ALL (*T-lineage acute lymphoblastic leukemia*) ou AML (*acute myeloid leukemia*) induites par mutagenèse insertionnelle. Le suivi est arrêté à la date de publication de chaque essai.

faible niveau, à l'exception du patient 2 qui a conservé un score 5 en raison de la persistance de légères manifestations autoimmunes. Dans l'ensemble, ces six patients ont vu disparaître leur eczéma et les épisodes hémorragiques. Le nombre d'infections opportunistes a été réduit et les symptômes autoimmuns se sont améliorés. Ainsi, la qualité de vie des 6 patients évaluables à long terme, s'est significativement améliorée puisque le nombre d'hospitalisations a été réduit et tous sont maintenant indépendants de transfusions de plaquettes.

Le bénéfice thérapeutique obtenu chez ces patients est attribué à l'efficacité de la reconstitution lympho-hématopoïétique à partir des progéniteurs génétiquement modifiés. En effet, la

détection du transgène dans les leucocytes des patients a permis la restauration de leurs fonctions immunitaires. L'analyse, par PCR quantitative (qPCR), du nombre de copies de vecteur intégré dans les différentes sous-populations cellulaires isolées à partir des prélèvements sanguins, a toutefois révélé des différences entre les patients. Le nombre de copies moyen varie de 0,1 à 1,0 copie par cellule dans la fraction mononucléée aux derniers points de temps analysés. Le vecteur est cependant retrouvé dans toutes les lignées d'origine hématopoïétique analysées avec des taux d'intégration plus élevés dans les populations lymphocytaires que dans les populations monocytaires et granulocytaires. L'expression de la protéine WASp, issue du vecteur intégré, est démontrée dans différentes populations lymphocytaires telles que les T CD4⁺ et CD8⁺, T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, les lymphocytes B et NK (*natural killer*). Aux derniers points de temps analysés, les pourcentages de cellules WASp⁺ varient de 34 à 84 % dans les lymphocytes T, de 14 à 85 % dans les lymphocytes NK et de 13 à 55 % dans les lymphocytes B. D'une façon remarquable, les taux de lymphocytes T et NK WASp⁺ augmentent au cours du temps chez les patients, confirmant l'avantage sélectif conféré par la restauration de l'expression de la protéine WASp dans ces cellules. Une thymopoïèse efficace a été mise en évidence chez les patients, comme en atteste la production de cellules T naïves, associée à la détection des cercles d'excision (*T-cell receptor excision circles* ou TREC) issus du processus de réarrangement du récepteur T (TCR). Après thérapie génique, le répertoire du récepteur des lymphocytes T est polyclonal, la stimulation antigénique des lymphocytes T devient robuste.

La restauration de l'activité cytolytique des cellules NK est montrée chez un patient. Les cellules dendritiques des patients traités sont à nouveau capables de former des podosomes, structures d'adhésion fortement dépendantes de la présence de WASp dans les cellules. Malgré la correction évidente de leurs fonctions immunitaires, les patients traités restent thrombopéniques, même si la majorité d'entre eux voient leur nombre de plaquettes augmenter. De plus, chez ces patients, les plaquettes produites expriment la protéine WASp et le volume moyen plaquettaire est normalisé. Cette correction partielle a permis aux patients d'être indépendants vis-à-vis des transfusions de plaquettes dès le 7^e mois après le traitement.

À côté de l'efficacité clinique obtenue, cet essai de thérapie génique, basé sur l'utilisation du vecteur lentiviral SIN, s'est également révélé dénué de génotoxicité. Aucun effet secondaire, lié à une prolifération cellulaire anormale, n'a été observé à ce jour. Le séquençage à haut débit de l'ADN cellulaire des sous-populations lymphocytaires et myéloïdes du sang périphérique des patients a été réalisé à différents points de temps et montre une grande diversité des sites d'insertion génomique du transgène sans dominance clonale. Ces résultats sont cohérents avec ceux récemment publiés sur 3 patients, traités à Milan, dans une étude indépendante mais utilisant le même vecteur lentiviral SIN [9]. Collectivement, les résultats obtenus à Milan, Londres et Paris montrent l'innocuité du vecteur lentiviral SIN utilisé comparé au vecteur rétroviral qui avait été utilisé initialement, dans le premier essai de thérapie génique du WAS menée par l'équipe du Pr C. Klein (Hanovre, Allemagne). Ce premier essai était basé sur l'utilisation d'un vecteur gamma-rétroviral portant des LTR actifs (vecteur gamma rétroviral, gRV) à l'origine de mutagenèse insertionnelle observée chez 7 des 9 patients traités ayant développé une leucémie ou un syndrome myélodysplasique (Figure 1),

⁴ Courbe d'estimation de Kaplan-Meier de la survenue d'événements indésirables liés au vecteur après traitement : cette courbe décroissante ou non, représente, grâce à une série de marches horizontales, la fraction de patients n'ayant pas subi d'événements indésirables liés au vecteur au cours du temps.



et ce malgré un bénéfice clinique initial avéré [10].

L'essai réalisé à Paris et Londres démontre, après que les premières preuves d'efficacité aient été obtenues sur des patients plus jeunes et moins sévèrement atteints [9], la faisabilité, l'efficacité et la sécurité de cette approche de thérapie génique pour traiter les patients pédiatriques relativement âgés souffrant de formes sévères du syndrome de Wiskott-Aldrich. Plusieurs études utilisant ce vecteur sont toujours en cours (dont une à Boston, États-Unis) afin d'inclure un nombre plus élevé de patients et de réaliser des observations sur de plus longues durées. Si l'ensemble de ces études confirme l'efficacité, la bonne tolérance au traitement et sa sécurité, la thérapie

génique pourrait être considérée dans un futur proche comme un traitement alternatif à la greffe allogénique de cellules souches chez les patients WAS ne pouvant pas bénéficier d'un donneur HLA-compatible. ♦

Efficity and safety of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Hacein-Bey-Abina S, Gaspar HB, Blondeau J, et al. Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. *JAMA* 2015 ; 313 : 1550-63.
- Albert MH, Notarangelo LD, Ochs HD. Clinical spectrum, pathophysiology and treatment of the Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol* 2011 ; 18 : 42-8.
- Thrasher AJ, Burns SO. WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol* 2010 ; 10 : 182-92.
- Pai SY, Notarangelo LD. Hematopoietic cell transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: advances in biology and future directions for treatment. *Immunol Allergy Clin North Am* 2010 ; 30 : 179-94.
- Kaufmann KB, Buning H, Galy A, et al. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med* 2013 ; 5 : 1642-61.
- Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 3132-42.
- Charrier S, Dupré L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Ther* 2007 ; 14 : 415-28.
- Modlich U, Navarro S, Zychlinski D, et al. Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol Ther* 2009 ; 17 : 1919-28.
- Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 2013 ; 341 : 1233151.
- Braun CJ, Bostuz K, Paruzynski A, et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: long-term efficacy and genotoxicity. *Sci Transl Med* 2014 ; 6 : 227ra33.

NOUVELLE

Tous les hépatocytes ne sont pas égaux entre eux !

Laurent Dollé¹, Hélène Gilgenkrantz²

Paradoxe des études sur la régénération du foie

Le foie des mammifères est organisé en lobules fonctionnels limités d'un côté par une veine centrale et de l'autre par une veine porte (Figure 1). Il est doté de pouvoirs régénératifs remarquables, indispensables au maintien de sa masse et à son bon fonctionnement. Ce processus observé *ad libitum* annonçait la quête du Graal pour un concept légendaire [1] ! Afin d'élucider les mécanismes qui concourent à ce don de régénération, les scientifiques ont développé des astuces techniques permettant d'induire artificiellement des lésions hépatiques chez le rongeur. Néanmoins, alors que d'innombrables études illustraient la capacité de différents types cellulaires

à reconstituer le parenchyme hépatique, moins juteuse fut la découverte de la vraie nature de ce compartiment [2, 3]. Pour faire simple, jusqu'à présent, deux théories s'affrontaient : l'idée qu'un pool de cellules souches approvisionne le foie en hépatocytes fonctionnels, par maturation de leur descendance suivant l'axe porto-central de la travée hépatocytaire, s'opposant au concept que la régénération résulte uniquement de la différenciation et/ou de la division d'hépatocytes adultes, sans intervention d'une cellule souche résiduelle chez l'adulte [4]. Si les dernières publications semblaient plutôt en faveur de cette dernière hypothèse, il faut admettre que la vue d'ensemble restait encore nébuleuse [2-6] !

L'hépatocyte perdure comme héros de l'homéostasie hépatique !

En raison d'une complexité initialement insoupçonnée (dans leur utilisation et leur nature), les modèles animaux ne sont plus aujourd'hui unanimement considérés comme pertinents dans la quête de l'identité des cellules souches [1]. En effet, très peu de ces modèles reproduisent l'étiologie, l'histoire naturelle et la progression des maladies hépatiques humaines. Par conséquent, conjecturales sont les conclusions apportées sur l'existence même de ces cellules souches chez l'homme ou sur leur potentielle utilité clinique. La tendance, pour disséquer cette capacité mythique, est donc de revenir sur un ancien concept : utiliser l'homéostasie d'un foie normal, c'est-

¹Laboratory of liver cell biology, department of biomedical sciences, faculty of medicine and pharmacy, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Bruxelles, Belgique.

²Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, université Paris-Descartes, 24, rue du faubourg Saint-Jacques, 75005 Paris, France.

ldolle@vub.ac.be

helene.gilgenkrantz@inserm.fr