



HAL
open science

Thérapie génique appliquée à l'hémophilie

Laure Musso

► **To cite this version:**

Laure Musso. Thérapie génique appliquée à l'hémophilie. Sciences pharmaceutiques. 2001. dumas-01440226

HAL Id: dumas-01440226

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01440226>

Submitted on 15 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2001

N° d'ordre

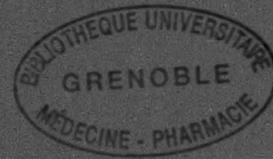
7037

**Thérapie génique
appliquée à
l'hémophilie**

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

Par Laure MUSSO

[Données à caractère
personnel]



Thèse soutenue publiquement le 10 septembre 2001 à 18 heures

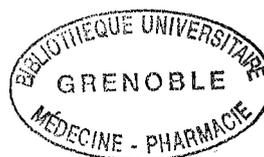
DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Monsieur E. DROUET : Président du jury
Madame M.H BARTOLI : Directeur de thèse
Madame A. PAGNIER : Assistant Chef de Clinique

*Thérapie génique
appliquée à
l'hémophilie*

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

Par Laure MUSSO
[Données à caractère personnel]



Thèse soutenue publiquement le 10 septembre 2001 à 18 heures

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Monsieur E. DROUET : Président du jury
Madame M.H BARTOLI : Directeur de thèse
Madame A. PAGNIER : Assistant Chef de Clinique

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	<i>Josette</i>	<i>Chimie Analytique</i>
BAKRI	<i>Abdelaziz</i>	<i>Pharmacie Galénique</i>
BENOIT-GUYOD	<i>Jean-Louis</i>	<i>Chimie Toxicologie et Eco- toxicologie</i>
CALOP	<i>Jean</i>	<i>Pharmacie Clinique et Bio- technique</i>
CUSSAC	<i>Max</i>	<i>Chimie Thérapeutique</i>
DECOUT	<i>Jean-Luc</i>	<i>Chimie Générale</i>
DEMENGE	<i>Pierre</i>	<i>Physiologie/Pharmacologie</i>
DROUET	<i>Emmanuel</i>	<i>Microbiologie-Immunologie</i>
FAVIER	<i>Alain</i>	<i>Biochimie</i>
GOULON	<i>Chantal</i>	<i>Physique-Pharmacie</i>
GRILLOT	<i>Renée</i>	<i>Parasitologie</i>
MARIOTTE	<i>Anne-Marie</i>	<i>Pharmacognosie</i>
RIBUOT	<i>Christophe</i>	<i>Physiologie-Pharmacologie</i>
ROUSSEL	<i>Anne-Marie</i>	<i>Biochimie</i>
SEIGLE-MURANDI	<i>Françoise</i>	<i>Botanique et Cryptogamie</i>
STEIMAN	<i>Régine</i>	<i>Biologie Cellulaire</i>
WOUESSIDJEWÉ	<i>Denis</i>	<i>Pharmacie Galénique</i>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

MAITRES DE CONFÉRENCE DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique
BARTOLI	Marie-Hélène	Pharmacie Clinique et Biotech.
BOUMENDJEL	Ahcène	Pharmacognosie
BURMEISTER	Wilhelm	Physique
CARON	Cécile	Biologie Moléculaire
CHARLON	Claude	Chimie Pharmacie
DELETRAZ	Martine	Droit Economie pharmaceutique
DIJOUX-FRANCA	M.-Geneviève	Pharmacognosie
DURMORT-MEUNIER	Claire	Virologie moléculaire structur
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique
FAURE	Patrice	Biochimie C
FAURE-JOYEUX	Marie	Physiologie-Pharmacologie.
FOUCAUD-GAMEN	Jacqueline	Bactériologie-Virologie.
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie Galénique
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique
GUIRAUD	Pascale	Biologie cellulaire
GROSSET	Catherine	Chimie analytique
HININGER-FAVIER	Isabelle	LBSO-Biochimie C
KRIVOBOK	Serge	Botanique-Cryptogamie
MORAND	Jean-Marc	Chimie thérapeutique
NICOLLE	Edwige	Chimie organique
PERA	Marie-Hélène	Chimie organique
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique Alimentaire
PINEL	Claudine	Parasitologie
RAVEL	Anne	Chimie Analytique
RIBUOT	Diane	Physio. Pharmaco
RICHARD	Jean-Michel	Chimie Toxico-Ecotoxicologie
RIONDEL	Jacqueline	Physiologie Pharmacologie
TAILLANDIER	Georges	Chimie organique
VILLEMAIN	Danièle	Physique Pharmacie
VILLET	Annick	Chimie analytique

A mes juges,

Monsieur Emmanuel DROUET,

Professeur de bactériologie / virologie en pharmacie.

Pour la qualité de ses enseignements et l'intérêt si spontané qu'il porte à tant de choses.

Il m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Je l'en remercie et le prie de trouver ici l'expression de mon grand respect.

Madame Marie-Hélène BARTOLI,

Maître de conférence en pharmacie.

Elle m'a encadrée dans la réalisation de ce travail et y a montré beaucoup d'intérêt.

Je la remercie vivement pour sa disponibilité permanente et pour l'accueil bienveillant et motivant qu'elle m'a toujours réservé.

Qu'elle veuille accepter l'expression de ma profonde gratitude.

Madame Anne PAGNIER,

Assistant Chef de Clinique.

J'ai été touché par la spontanéité avec laquelle elle a accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je lui adresse mes sincères remerciements.

Qu'elle trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Et à :

Madame Claire BARRO,
Praticien hospitalier.

Qui aurait dû faire partie de ce jury mais risque de ne pouvoir assister à la soutenance.

Je tiens à la remercier grandement pour l'attention qu'elle a portée à ce document et pour les discussions que nous avons pu avoir ensemble.

Madame Christine CHEVALLIER,
Pharmacien hospitalier.

Qu'elle soit remerciée pour la gentillesse de son accueil et l'écoute qu'elle m'a portée.

A ma famille, qui a su créer autour de moi cet autre univers si loin de la faculté et des études,

Et à mes frères qui m'ont si gentiment prêté leur poste de jeu
(transformé pour l'occasion en véritable poste de travail),

A Benjamin et à Marc pour leur aide informatique,

A tous les autres qui par leur scanner, lecteur zip,
imprimante... et relecture du présent document ont permis
l'aboutissement de ce travail,

Au personnel de la bibliothèque de médecine-pharmacie,

A Frédéric qui, depuis le début de cette histoire, met plus de
joie dans ma vie, plus d'amour autour de moi,

A mes amis, pour tous ces moments partagés et pour tous ceux qu'ils nous restent à
vivre ensemble,

Et enfin à la communauté hémophile qui a motivé ce travail,

... *En ce jour de soutenance de thèse, je dédie ce travail.*

PLAN

INTRODUCTION.....	p 11
Partie 1/ HEMOPHILIE : GENERALITES.....	p 14
- 1 Définition.....	p 15
- 2 Signes cliniques.....	p 19
- 3 Biologie.....	p 23
- 4 Carte d'identité des f VIII et IX.....	p 25
- 5 Traitement actuel.....	p 29
- 6 Les inhibiteurs dans la population hémophile.....	p 33
Partie 2/ THERAPIE GENIQUE : APPROCHE GLOBALE.....	p 38
Chapitre 1 : UN NOUVEAU REMEDE POUR L'HEMOPHILIE.....	p 39
- 1 Qu'est ce que la thérapie génique ?	p 40
- 2 Avantages de la thérapie génique	p 42
- 3 Risques de la thérapie génique.....	p 42
- 4 Pré-requis pour la thérapie génique : sûreté et efficacité.....	p 44
- 5 L'hémophilie : un modèle pour la thérapie génique ?	p 45
Chapitre 2 : THERAPIE GENIQUE APPLIQUEE A L'HEMOPHILIE :	
GENERALITES :	P 46
- Technologie de la thérapie génique.....	p 47
1 Principe des méthodes <i>ex vitro</i> , <i>ex vivo</i> , <i>in vivo</i>	p 48
1.1/ transfert de gène <i>in vitro</i>	p 48
1.2/ transfert de gène <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i>	p 48
a/ mécanisme.....	p 48
b/ transfert de gène <i>ex vivo</i>	p 49
c/ transfert de gène <i>in vivo</i>	p 50

- Expérience <i>in vivo</i> sur l'animal.....	p 97
1/ rétrovirus.....	p 97
2/ adénovirus.....	p 98
2.1/ premières expériences.....	p 98
2.2/ succès.....	p 99
2.3/ limites.....	p 99
2.4/ virus de deuxièmes et troisièmes générations.....	p 99
3/ Virus Adéno-Associés.....	p 105
3.1/ études sur les animaux sains.....	p 105
3.2/ cinétique sanguine d'apparition du facteur IX.....	p 108
3.3/études sur les animaux hémophiles.....	p 109
- tableau : facteur IX : bilan des études.....	p 113

Chapitre 2 : EXPERIENCES UTILISANT DES VECTEURS VIRAUX POUR

TRAITER L' HEMOPHILIE A.....	p 114
------------------------------	-------

- Tableau de présentation des expériences : expression du facteur VIII <i>in vivo</i>	p 117
- Expérience <i>ex vivo</i> :	p 121
1/rétrovirus : un début de développement peu prometteur.....	p 121
2/ rétrovirus : un premier succès.....	p 126
3/ rétrovirus : autres succès.....	p 127
- Expérience <i>in vivo</i> sur l'animal	p 128
1/rétrovirus.....	p 128
2/ adénovirus.....	p 130
2-1 études sur l'animal non hémophile.....	p 130
2-2 études sur l'animal hémophile.....	p 131
2-3 limites des adénovirus.....	p 135
3/ virus adéno-associés.....	p 135
- Tableau : facteur VIII : bilan des études.....	p 138
- Tableau : vue d'ensemble des expériences employant des vecteurs viraux	p 139

chapitre 3: METHODES UTILISANT DES VECTEURS NON VIRAUX POUR TRAITER LES HEMOPHILIES A et B.....	p 140
1/ généralités.....	p 141
2/ électroporation.....	p 144
3/ endocytose médiée par un récepteur	p 146
3/ liposomes.....	p 147
4/ thérapie génique correctrice.....	p 150
4-1 usage de monomères d'ADN.....	p 151
4-2 usage de chimères.....	p 152
 Partie 4/ APPLICATION A L'HOMME.....	 p 158
- 1 Choix des patients.....	p 159
- 2 Une thérapeutique pour quand ?	p 168
2-1 présentation des essais en cours.....	p 169
2-2 essai clinique de phase I employant les AAV.....	p 169
2-3 essai clinique de phase I employant l'électroporation.....	p 171
2-4 essai clinique de phase I employant les rétrovirus.....	p 173
 CONCLUSION.....	 p 175
 BIBLIOGRAPHIE.....	 P 178
LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES.....	p 187



INTRODUCTION



La population hémophile est une population atteinte d'un trouble de la coagulation (déficit en facteur VIII ou IX), susceptible d'entraîner des saignements non seulement externes et visibles, mais aussi des saignements internes, souvent plus lourds de conséquences. C'est une population aux articulations prématurément vieillies et au traitement parfois lourd, marquée depuis le début des années 80 par le scandale du sang contaminé, par cette confiance trahie, et par toutes ses victimes.

Aujourd'hui, la population hémophile se doit bien sûr de rester vigilante pour éviter à jamais un drame comme celui-ci ; elle se doit aussi maintenant d'avancer et de retrouver espoir :

En effet, depuis cette période, le développement des moyens thérapeutiques mis à la disposition des hémophiles s'est accru considérablement, au fur et à mesure que des progrès étaient réalisés dans la connaissance de la fonction des facteurs de coagulation, des mécanismes mis en route et de la structure des gènes impliqués. Cette rapidité globale des progrès effectués résulte de deux points : la grande expérience d'utilisation et de manipulation des produits dérivés du plasma, et la nécessité de trouver un moyen de traitement sûr et efficace pour les hémophiles.

Une étape majeure dans l'histoire de l'hémophilie a ainsi été franchie : grâce au génie génétique et aux techniques de l'ADN recombinant, cette communauté bénéficie déjà de traitements plus sûrs. Les dégâts causés à long terme par des saignements chroniques peuvent de plus être prévenus par un traitement prophylactique. Ces traitements demeurent malheureusement coûteux, trop pour les pays du tiers monde, et ils restent lourds à supporter, trop sûrement pour les enfants.

Suite à l'avancée des technologies en génétique, suite aux travaux de nombreux chercheurs, une autre alternative pointe aujourd'hui : et s'il était possible d'apporter à ces patients un gène qui

synthétiserait pour la vie, la protéine qui leur manque? Et si mieux encore il était possible de corriger leur propre gène défectueux?

C'est cet espoir qui naît actuellement pour la population hémophile. Mais cet espoir très prometteur porte tout de même ses risques et doit éveiller notre vigilance.

C'est cet espoir, qui pourrait mettre encore plusieurs années à voir le jour, que nous allons découvrir en détail... au travers des nombreuses expériences menées *ex vivo* et *in vivo* sur l'animal et faisant usage de vecteurs viraux d'abord, puis non viraux par la suite, au travers enfin des premiers essais cliniques réalisés sur l'homme.

PARTIE 1

généralités sur l'hémophilie

1. Définition

Le mot hémophilie vient de deux mots grecs (web 3) :

- "haîma" qui signifie sang
- "philia" qui signifie affection

L'hémophilie est en effet une maladie hémorragique liée à un déficit héréditaire touchant la synthèse d'un facteur protéique normalement produit par le foie et nécessaire à la coagulation sanguine.

Cela signifie que :

- **Le sang d'une personne atteinte d'hémophilie ne coagule pas normalement :**

Les saignements ne sont pas plus abondants, ni plus rapides que la normale, mais ils durent plus longtemps.

On croit souvent que les hémophiles saignent beaucoup à la moindre petite coupure. En fait, les blessures superficielles ne sont généralement pas graves. Les saignements internes par contre ont des conséquences beaucoup plus graves, notamment s'ils concernent les articulations (en particulier genoux, chevilles et coudes) : ils entraînent alors des arthropathies fréquentes et débilitantes. Ces saignements peuvent aussi toucher les tissus mous et les muscles ; ils mettent la vie de l'hémophile en danger dès lors qu'ils affectent un organe vital (le cerveau par exemple) ; l'atteinte des espaces clos critiques, comme l'espace intracrânien et rétro péritonéal, peut ainsi induire des complications graves et mortelles.

- **L'enfant naît avec la maladie :**

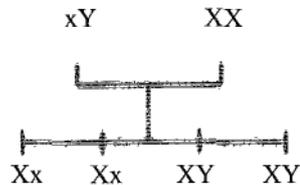
Cette maladie héréditaire affecte les gens de toutes origines ethniques.

Elle est transmise selon le mode récessif lié au chromosome X :

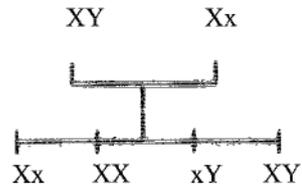
- Les hommes peuvent transmettre le gène atteint à leurs filles mais pas à leurs fils.
- Les femmes sont dites « conductrices », elles transmettent l'hémophilie, maladie qui atteint presque exclusivement les garçons. Les femmes hémophiles sont en effet des cas rares, puisqu'une femme n'est atteinte que si son père est hémophile et que sa mère est porteuse du gène défectueux).

Ainsi, en notant "x" le chromosome X porteur du gène défectueux, le génotype d'un homme hémophile est "xY", celui d'une femme porteuse "Xx" et celui d'une femme hémophile "xx". Les différents cas possibles dans la descendance d'une famille hémophile sont alors représentés de cette façon :

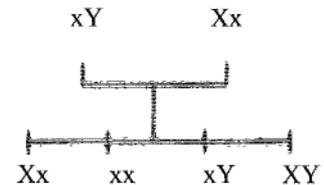
Figure 1. Différents cas possibles dans la descendance



Le père hémophile engendre 100% de filles conductrices et 100% de fils indemnes.



La mère conductrice donne naissance à 25% de filles conductrices et à 25% de fils hémophiles.



Une conductrice et un hémophile donnent naissance à 25% de filles conductrices, 25% de filles hémophiles et 25% de fils hémophiles.

On distingue deux types d'hémophilie selon le facteur de coagulation touché :

- Un **déficit en facteur VIII** est appelé **hémophilie A**.

C'est le type d'hémophilie le plus répandu : **85% des cas**.

- Un **déficit en facteur IX** est appelé **hémophilie B**.

Il correspond environ à **15% des cas**.

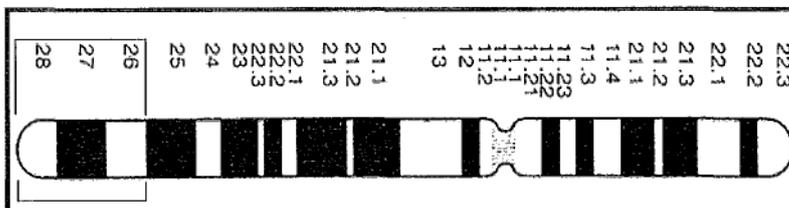
- Hémophilie A et B sont toutes deux très rares : leur fréquence cumulée est de **1 pour 10 000** naissances en France, avec un pourcentage de néomutation élevé : 30% des enfants hémophiles (des garçons majoritairement) qui naissent n'ont aucun parent affecté par le gène de l'hémophilie.
- Cliniquement, les deux formes sont identiques ; les deux types d'hémophilies n'ont d'ailleurs été différenciés que dans les années cinquante, lorsque deux équipes de chercheurs indépendantes ont démontré que le plasma extrait d'un groupe de patient pouvait corriger les troubles de coagulation de l'autre groupe.

Les mutations génétiques responsables de la maladie peuvent être des délétions, des mutations ponctuelles, des insertions ou des inversions ayant lieu sur un locus précis du bras long du chromosome X ; ces mutations sont à l'origine d'un déficit en facteur du gène touché. Selon l'importance de ce déficit, on classe les hémophilies en trois groupes (web 3) :

- Forme grave : taux de facteur : < 1% de la normale.
- Forme modérée : taux de facteur : 1 à 5 % de la normale.
- Forme mineure : taux de facteur : 5 à 30 % de la normale.

Les formes graves se retrouvent chez 60 à 80% des sujets atteints d'hémophilie A et chez 50% de ceux atteints d'hémophilie B.

Figure 2. Localisation générale des mutations responsables de l'hémophilie
Celles-ci sont situées sur le bras long du chromosome X, dans la région encadrée :
Xq26, Xq27, Xq28



Nota : par abus de langage, on parle aussi quelques fois d'hémophilie dans le cas de déficits touchant d'autres facteurs de coagulation (61) : fibrinogène, prothrombine, facteurs V, VII, X, XI et XIII. Ces anomalies sont toutefois beaucoup plus rares que les hémophilies proprement dites. Elles ne sont pas liées au chromosome X (le chromosome mis en jeu est selon le facteur touché le chromosome 1, 4, 11 ou 13), et sont transmises selon le mode autosomique récessif.

Certains auteurs parlent aussi d'hémophilie "acquise" pour désigner le développement, par certains sujets non hémophiles, d'anticorps contre un de leurs facteurs de coagulation, le plus souvent le facteur VIII mais également le IX. Cette situation est rencontrée lors de pathologies auto-immunes (lupus...), des hémopathies, de la grossesse ou du post-partum ou sans étiologie retrouvée et les patients sont traités par immunosuppression.

Ces deux cas ne feront pas l'objet de ce document qui se limitera aux hémophilies A et B au sens strict.

2. Signes cliniques

L'importance des signes varie selon la sévérité du déficit en facteur de coagulation, mais hémophilie A et B révèlent les mêmes signes cliniques (4, 43) :

1/ Les formes sévères :

Les hémorragies débutent tôt dans la vie : rarement en période néonatale (sauf circoncision), le plus souvent autour de 12-18 mois, au moment des premiers pas. Elles surviennent après un traumatisme minime ou même spontanément.

☆ les hémarthroses :

Elles correspondent à des hémorragies au niveau d'une articulation.

Dans l'ordre de fréquence, sont touchés : les genoux, les coudes, les chevilles et les poignets. En fait, toute articulation ayant une membrane synoviale peut être atteinte, mais si les articulations sus-citées sont les plus touchées ce n'est pas un hasard : elles possèdent toutes trois un mécanisme de charnière, sont exposées à toutes sortes de traumatismes et sont l'objet de contraintes à la fois latérales et à type de torsion. Les genoux et les chevilles doivent supporter le poids du corps et les forces impliquées pour s'agenouiller, s'asseoir, se tenir debout, marcher et courir. Les coudes sont souvent exposés à des coups directs. En comparaison, les articulations comme la hanche ou l'épaule sont mieux protégées.

Le tableau clinique typique présente : douleur, gêne au minimum, articulation chaude et gonflée, impotence fonctionnelle, position antalgique.

Lorsqu'une articulation est le siège de saignements répétés, la formation à long terme de dégâts articulaires est alors possible, ce sont les arthroses hémophiliques :

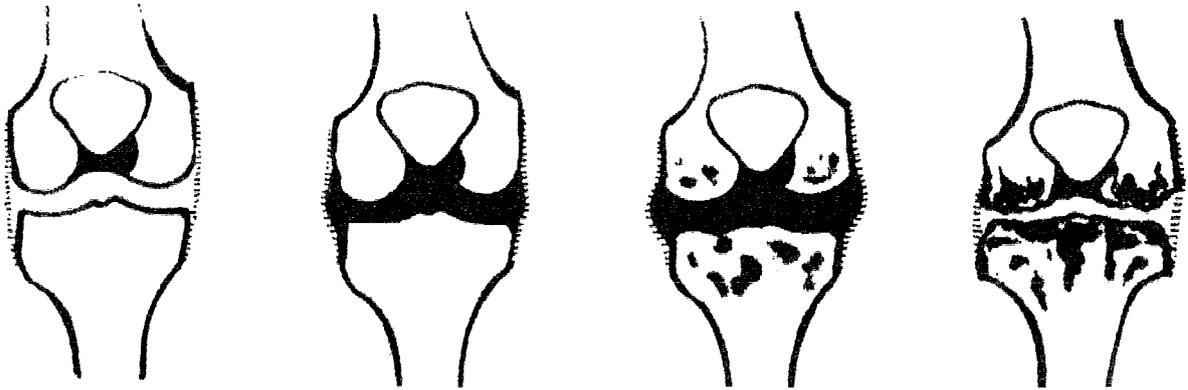


Figure 3 (Jones P. 1992, 43).

Au début, il y a rupture d'un petit vaisseau au niveau de la synoviale, qui va déverser du sang dans la cavité articulaire. Non contrôlé, ce saignement va continuer jusqu'à ce que la pression exercée par la capsule articulaire et les tissus environnants soit suffisante pour l'arrêter.

A ce stade, la capsule est distendue et sensible. Il s'en suit une recherche par l'hémophile d'une position antalgique (coude et genou partiellement fléchis, cheville partiellement étendue), qui va mettre la capsule dans une position correspondant à son plus grand volume. Cet espace supplémentaire profitera à la poursuite du saignement, entraînant ainsi une douleur aiguë qui se poursuivra au fur et à mesure de la distension ultérieure.

Tandis que l'articulation se remplit de sang, un deuxième processus se met en place : la destruction des globules rouges à l'intérieur de la cavité et l'élimination des débris par les cellules phagocytaires. La synoviale commence alors à se recouvrir de fer et d'autres débris globulaires et peut devenir inflammatoire (synovite).

La surface du cartilage articulaire, qui n'est alors plus protégée par le mince film de liquide synovial, va être progressivement attaquée. Si les saignements dans cette même articulation se répètent, le cartilage va se fragmenter et devenir irrégulier, la friction au niveau de l'articulation va s'accroître, la synoviale s'épaissir, s'engorger et se charger de débris, les ligaments et les tendons se distendent. Au stade ultime, des fragments de cartilage vont disparaître, laissant l'os à nu dans la cavité ; cet os va alors se ramollir, s'excaver, de petites zones de tissu nécrosé vont former des kystes et les extrémités osseuses, en l'absence de la tension et du support des ligaments, vont se déformer et prendre des positions inhabituelles :

un handicap chronique s'installe progressivement.

☆ les **hématomes musculaires** :

Un saignement intramusculaire risque de toucher non seulement le muscle lui même mais aussi les nerfs et les vaisseaux sanguins présents à l'intérieur (compression des tissus voisins) entraînant ainsi douleurs, paralysies, pertes de sensibilités. Tout hématome intramusculaire peut donc être à l'origine de complications dont la gravité est fonction de son volume et de son siège anatomique. Ces hématomes mettent en jeu :

- Soit le pronostic vital : ce sont par exemple les hématomes du larynx et du plancher de la bouche (asphyxie)
- Soit le pronostic fonctionnel : ce sont les hématomes :
 - De la fesse, avec signes de compression sciatique,
 - Du creux poplité,
 - Du psoas qui entraîne une paralysie crurale,
 - De la loge antérieure de l'avant bras, avec risque de perte de fonctionnalité de la main,
 - Rétro-orbitaire aboutissant à la cécité.

Tous ces hématomes sont d'une importance particulière quant à la précocité du diagnostic et du traitement.

☆ les **hémorragies muqueuses** :

rares, elles peuvent cependant être graves :

- hémorragies digestives
- épistaxis persistantes
- hématuries d'origine rénale

☆ les **hémorragies intracrâniennes** :

heureusement rares, elles entraînent décès ou séquelles neurologiques.

2/ les formes modérées et mineures :

Le tableau clinique est atténué, sans hémarthrose ; il n'y a pas d'hémorragie spontanée mais on observe des hémorragies provoquées après un traumatisme ou une petite intervention chirurgicale.

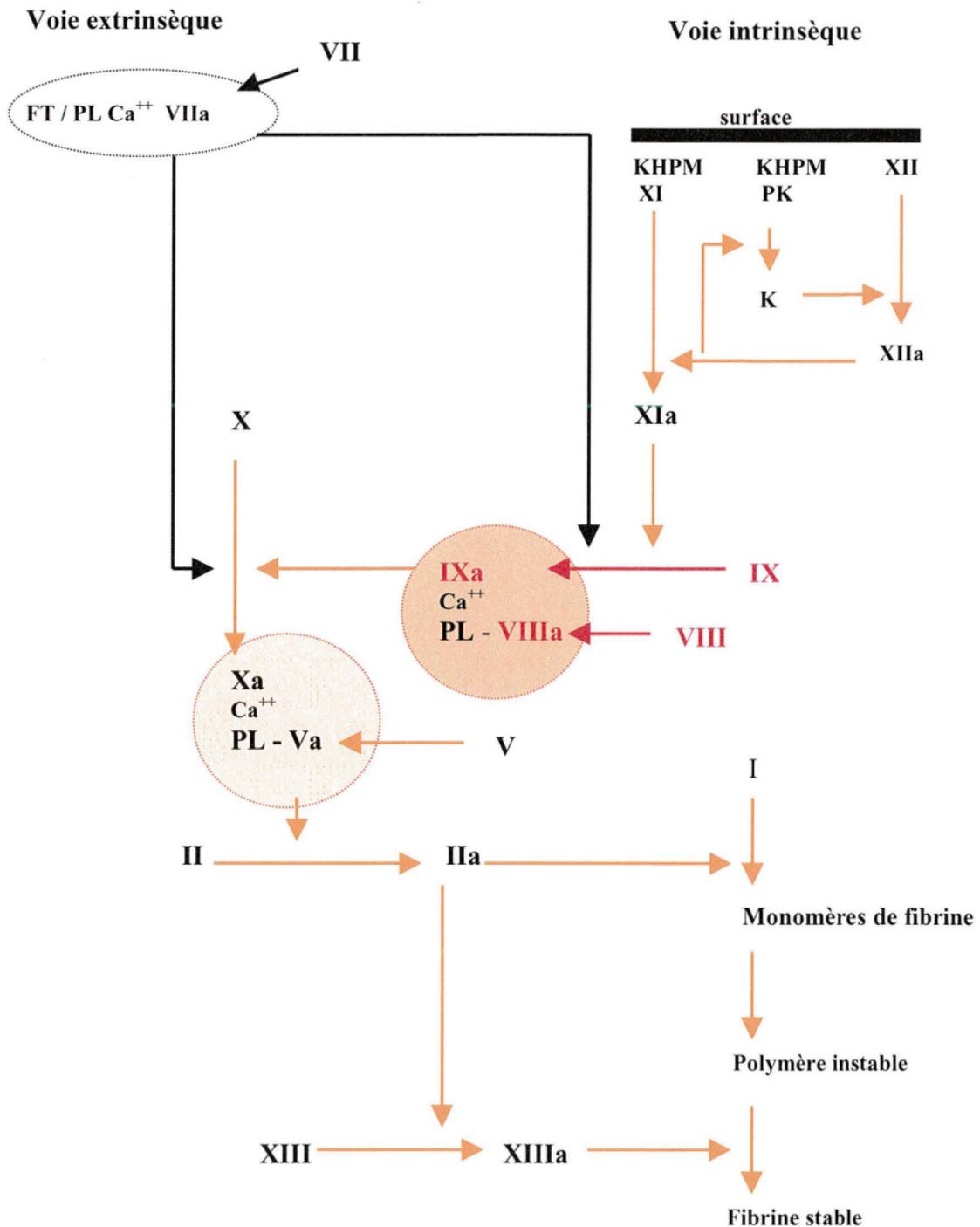
Elles peuvent être l'occasion d'un diagnostic tardif, établi à l'âge adulte.

3. Biologie

1/ Rappel : place des facteurs VIII et IX dans le mécanisme de coagulation :

Le facteur IX possède une activité enzymatique de type serine-protéase jouant un rôle clé dans la cascade de la coagulation sanguine. Il forme avec le facteur VIIIa (son cofacteur) un complexe capable d'activer le facteur X.

Figure 4. rappel : voies extrinsèque et intrinsèque de la coagulation ; les facteurs VIII et IX sont indiqués en rouge.



2/ Diagnostic biologique des hémophilies

Il est évoqué devant un allongement du TCA associé à un temps de Quick et un temps de saignement normaux. Le dosage spécifique des facteurs anti-hémophiliques permet de typer l'hémophilie et d'apprécier l'importance du déficit.

Tableau 1 : d'après MH Bartoli (4)

TS	normal (exploration de l'hémostase primaire)
TQ	normal (exploration de la voie extrinsèque de la coagulation)
TCA	nettement allongé (exploration de la voie intrinsèque de la coagulation)
TT	normal
Plaquettes	normales
Fibrinogène	normal
Taux de f VIII	< 30% => hémophilie A
Taux de f IX	< 30% => hémophilie B

4. Cartes d'identité et structures des facteurs VIII et IX

Tableau 2. Informations recueillies dans les articles 20, 26, 44, 45. Principales caractéristiques des fVIII et fIX

	Facteur VIII	Facteur IX
Taux normal chez l'homme	200 ng/ml ou 1000 mU/ml	5 µg/ml
Taux considéré comme thérapeutique	5% soit 10 ng/ml	5% soit 0.25 µg/ml
Demie vie	12h	20h
Chromosome touché	X, région q28 50% des hémophilies sévères sont causées par des mutations ponctuelles 50% sont dues à des inversions de portions de gènes entre l'intron 22 et une autre portion de génome située environ 500 kb avant l'extrémité 5'	X, région q26-q27 Plus de 300 mutations ont été identifiées, la plupart correspondant à la substitution d'une seule base
Anticorps neutralisants	Concerne 20 % des patients traités	Concerne 3% des patients traités
	Les facteurs de risques identifiés incluent : la nature de la mutation (plus la partie du génome touchée est grande, plus les risques de synthétiser des anticorps sont importants), la réponse immune individuelle et les circonstances d'injections du facteur de coagulation (inflammation concomitante ou tissus alentours abîmés)	
Taille de l'ADN total	186 kb	33 kb
Taille de l'ADN codant ou cDNA	7 kb pour le gène entier 4.5 kb pour le gène BDD	1,4 kb
Taille de la protéine	2351 Acides aminés soit 300 kD	415 Acides aminés soit 55 kD

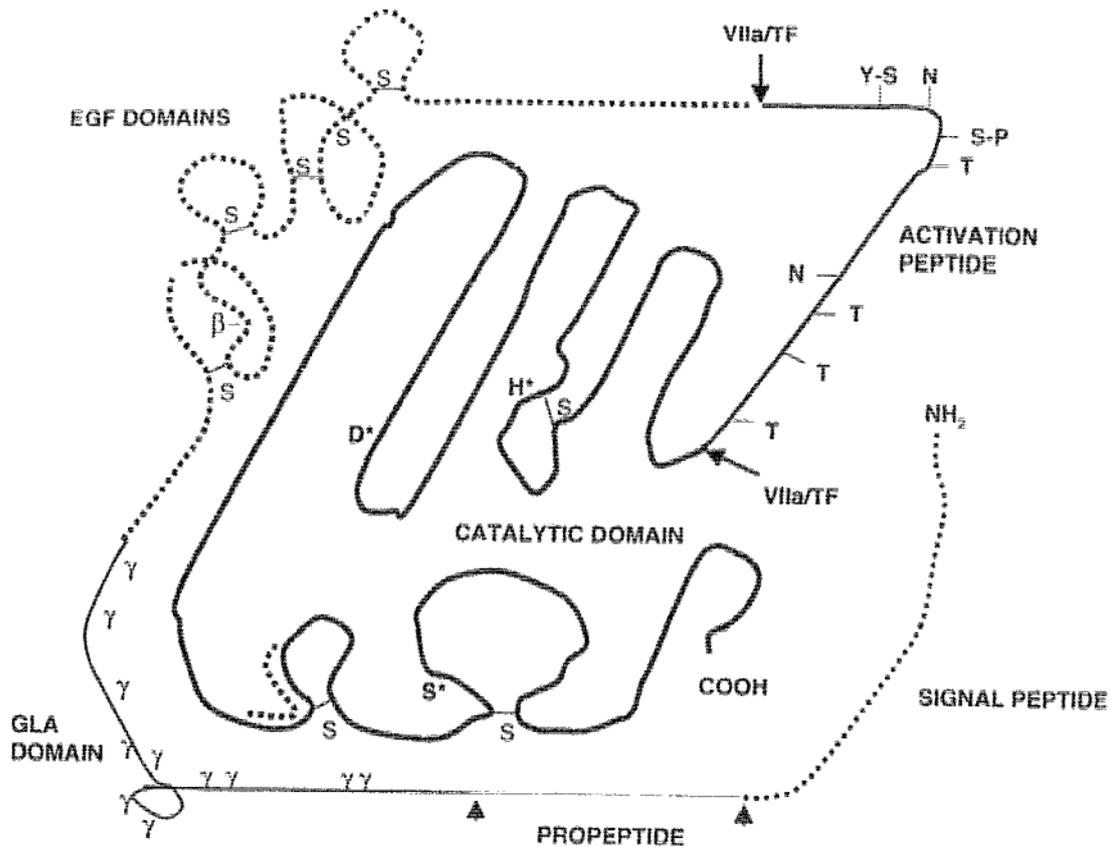
	Facteur VIII	Facteur IX
Structure de la protéine néo-synthétisée	1/ domaine A1 2/ domaine A2 3/ domaine B 4/ domaine A3 5/ domaine C1 6/ domaine C2	1/ Peptide signal 2/ Propeptide 3/ Domaine Gla : riche en AA devant subir une γ carboxylation afin de permettre la fixation d'ions calcium et l'adhésion du facteur IX aux membranes 4/ Domaine des AA aromatiques 5/ et 6/ Domaines type facteurs de croissance 7/ Domaine serine protéase
Modifications post-traductionnelles nécessaires à la synthèse d'une protéine fonctionnelle	1/ N glycosylation de certains AA 2/ Sulfatation des résidus tyrosines 346, 718, 719, 723, 1664 et 1680 3/ Modification des N oligosacharrides greffés en formes complexes et greffe d'oligosaccharides sur une quinzaine de résidus serines et thréonine 4/ Clivage en deux chaînes	1/ β hydroxylation (Asp 64) N glycosylation (Asp 157 et 167) O glycosylation (Ser 53 et 61) 2/ γ carboxylation des AA glutamates (Glu 7, 8, 15, 17, 20, 21, 26, 27, 30, 33, 36, 40) 3/ Clivage du propeptide
Facteurs limitant l'activité	Accès au facteur von Willebrand* Interaction avec BiP**	γ carboxylation Clivage du propeptide

* La liaison du facteur VIII au facteur von Willebrand dans la circulation sanguine lui permet d'accroître sa demi-vie (demié vie du facteur VIII lié au facteur VWF = 12h, demié vie du facteur VIII isolé = 2h).

** BiP (immunoglobulin Binding Protein) est une protéine chaperon du réticulum endoplasmique capable de se lier au facteur VIII. Sa synthèse est induite par le stress cellulaire, la présence de protéines incomplètes ou de sous-unités non assemblées dans le réticulum endoplasmique. L'expression du facteur VIII peut elle-même induire la synthèse de BiP.

Pour rejoindre la circulation sanguine, le facteur VIII a besoin d'être détaché de BiP ; cette étape demande une consommation importante d'ATP.

Fig 5. Kay MA 1999 (45) : Structure du facteur IX et modifications post-traductionnelles.

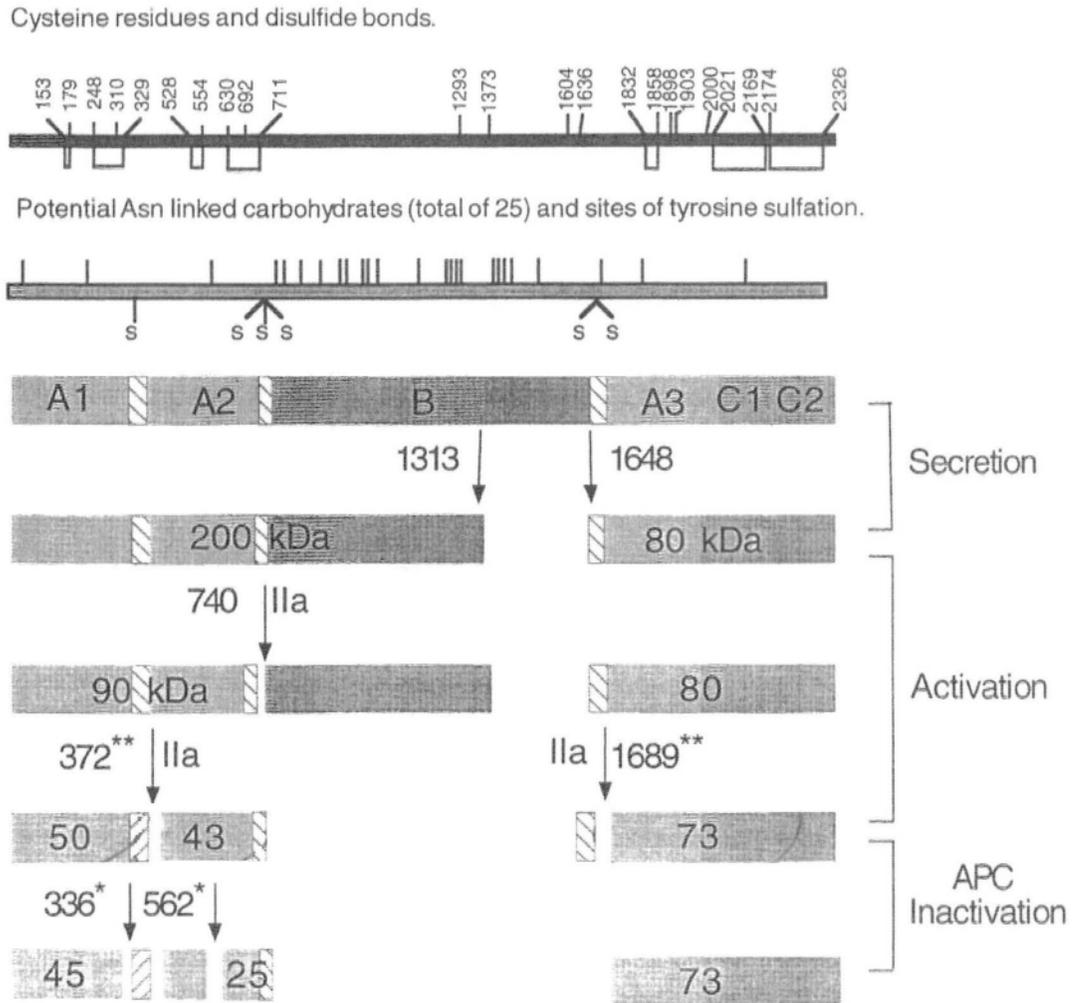


Le facteur IX est composé de 6 régions (représentées par différents types de lignes) :

- région du peptide signal,
- région du propeptide,
- domaine des acides glutamiques dicarboxylés,
- domaine type facteur de croissance épidermiques (EGF),
- peptide d'activation
- domaine à activité catalytique sérine-protéase.

Les flèches courtes représentent les sites de clivage du propeptide et du peptide signal. Les flèches longues représentent les clivages effectués par les facteurs VIIa et XIa pour activer le facteur IX. Les acides glutamiques γ carboxylés sont indiqués par la lettre γ , les acides β hydroxy-aspartiques par la lettre β . La région qui interfère avec le facteur VIII est signalée par une ligne pointillée doublant la ligne principale. Sont aussi indiqués les sites d'addition d'oligosaccharides aux résidus asparagines (N), serines (S) et thréonines (T), les tyrosines sulfatées (Y-S), les serines ayant subi une phosphorylation (S-P), les ponts disulfures (S) et la triade catalytique (D*, H*, S*).

Figure 6. Kay MA 1999 (45) : Structure du facteur VIII et devenir dans la cellule hépatique.



Le facteur VIII néosynthétisé est composé de 3 domaines : le domaine A trois fois répété avec un certain degré d'homologie -A1 (acides aminés 1 à 336), A2 (372 à 740), A3 (1690 à 2020)-, le domaine B (acides aminés 740 à 1648) et le domaine C répété lui deux fois de façon homologue -C1 et C2 (acides aminés 2021 à 2332)-.

La protéine comporte 25 sites potentiels de glycosylation, 19 étant situés sur le domaine B.

Sur le schéma du haut sont représentés les ponts disulfures. Sur celui du milieu, sont signalés les sites de N-glycosylation (barres verticales) et de sulfonation des tyrosines. Ces mêmes zones riches en acides aminés tyrosines sont représentées sur le schéma du dessous par des zones hachurées reliant les différents domaines.

A l'intérieur des hépatocytes cette protéine néosynthétisée est ensuite clivée à deux niveaux du domaine B, pour générer deux peptides, une chaîne lourde d'environ 200kDa (composée de 2 domaines A et d'un domaine B), et une chaîne légère d'environ 80kDa (composée d'un domaine A et de deux domaines C). Les clivages nécessaires à l'obtention d'un facteur VIII actif sont indiqués par ** (action de la thrombine), ceux amenant son inactivation par * (action de la protéine C activée ou PCa).

5. Traitement actuel

Ces traitements reposent sur l'injection par voie intraveineuse du facteur déficitaire (44) et l'administration des produits peut se faire selon deux modalités :

- **Traitement substitutif :**

Administration uniquement lors des troubles de coagulation, suite à un choc, une blessure...

C'est actuellement le mode de traitement le plus utilisé en France et aux USA.

Intérêt : traitement des hémorragies et limitations de leurs complications

Limites : n'empêche ni la douleur, ni l'inflammation associée,

ne prévient ni les saignements, ni les atteintes des articulations

- **Traitement prophylactique (58) :**

Administration hebdomadaire ou pluri-hebdomadaire du facteur, en l'absence de signes cliniques, et si possible dès l'âge de 1 ou 2 ans.

Ce traitement est la référence dans les pays nordiques (Suède notamment). Il commence à être pratiqué en France chez les enfants hémophiles sévères.

Intérêt : prévention des hémorragies et des arthroses hémophiliques

Limites : coût élevé, potentiel veineux limité, injections nombreuses et mal vécues (enfant)

On trouve actuellement deux sortes de produits (4) :

Ceux ayant une origine plasmatisque : - concentrés de facteur Haute Pureté (f IX)

- concentrés de facteur Très haute Pureté (f VIII et IX)

- concentrés de facteur immunopurifiés (f VIII et IX)

Ceux ayant une origine biotechnologique : facteurs humains recombinants (f VIII et IX) :

produits par des cellules animales génétiquement

modifiées suite à l'insertion d'un gène humain.

L'histoire de ces produits (61) a débuté avec la commercialisation dans les années 1970 de concentrés de facteurs dérivés du plasma. Ces produits, alors largement adoptés par les pays industrialisés, étaient cependant fabriqués à partir de plasma recueillis sur des centaines de personnes, et pour cette raison invariablement contaminés par les virus des hépatites B et C, causant ainsi des hépatites post-transfusionnelles chez la quasi totalité des hémophiles les ayant reçus.

Les hépatites chroniques étaient alors communes. On les pensait cependant relativement peu sévères et non évolutives ; les bénéfices apportés par les concentrés plasmatiques étaient donc supérieurs aux risques.

Cette perception optimiste a dramatiquement changé au début des années 1980, quand 60 à 70% des patients hémophiles sévères d'Europe et des USA ont été contaminés par le virus de l'immunodéficience humaine (ou VIH) suite à la transfusion de concentrés plasmatiques.

Depuis maintenant une quinzaine d'années, ces concentrés sont plus sûrs : les procédures d'inactivation aujourd'hui utilisées sont de 2 types : inactivation par la chaleur (méthode physique) ou par addition d'un solvant organique ou d'un détergent (méthodes chimiques).

Les méthodes chimiques sont les plus utilisées du fait de leur haute efficacité sur les virus HBV, HCV et HIV. Elles sont cependant inefficaces sur les virus non enveloppés, tels que le virus de l'hépatite A et les parvovirus. Ainsi, actuellement, les procédures d'inactivations utilisent les deux sortes de méthodes (61).

Ceci ne peut cependant éliminer la transmission du parvovirus B19 (non enveloppé et extrêmement résistant à la chaleur), et même si ce virus ne semble pas être pathogène pour l'homme, il est la preuve que d'autres agents infectieux encore inconnus ou méconnus peuvent être transmis : le doute concernant les agents responsables de la maladie de Creutzfeld-Jacob ou de l'ESB est par exemple toujours présent (60).

Les produits recombinants offrent face à tous ces doutes une sécurité bien plus grande. Ceci l'est d'autant plus pour les produits de deuxième génération qui, n'étant plus stabilisés par l'albumine (coupure en plus petites molécules ou stabilisation par des sucres) présentent un risque infectieux moindre (60). Ces produits permettent de plus certaines avancées thérapeutiques : le facteur VIII synthétisé à partir du gène BDD (B deleted domain) se montre par exemple plus facile à produire (sécrétion plus efficace hors des cellules de culture) et moins sensible à la dégradation enzymatique.

Ces facteurs recombinants sont cependant 2 à 3 fois plus chers, fréquemment en rupture de stock (capacité de production limitée), ce alors que les produits dérivés du sang deviennent de plus en plus sûrs. La politique d'utilisation des deux types de produits (recombinant ou dérivés du plasma) dépend donc de chaque pays : alors que dans certains pays quasiment tous les hémophiles reçoivent des facteurs recombinants (Danemark, Irlande), ils ne sont que 60% aux USA et 52% en Allemagne. L'Angleterre et l'Italie les distribuent eux prioritairement aux personnes nouvellement diagnostiquées ou non contaminées par les virus HBV, HCV, HIV...(61). Ces choix sont toutefois à adapter à la disponibilité des produits. Ainsi, l'Europe entière est en passe de manquer de facteur anti-hémophilique, suite à la suspension de la production du facteur VIII recombinant de Bayer aux USA (traçabilité du produit jugée insuffisante par la FDA) : la situation de pénurie reconnue au Royaume-Uni (mai 2001) et confirmée en Allemagne (juin 2001) : de fil en aiguille elle s'étend à toutes les versions de facteurs VIII recombinants disponibles, ce alors que les fabricants de dérivés plasmatiques ne peuvent prendre le relais et répondre immédiatement à la forte demande. Il a donc dû être décidé dans certains pays de reporter dans la mesure du possible les interventions chirurgicales sur des sujets hémophiles et de réduire les consommations de facteur VIII dans les situations non urgentes (comme les traitements prophylactiques dans le cadre d'efforts importants fournis par les patients et dans des centres de rééducations).

Au coût humain s'ajoute un coût économique : aux USA, le traitement d'un patient hémophile sévère coûte entre 100 000 et 200 000\$ par an, soit pour l'ensemble des USA une dépense de 1.5 billion de dollars/an (41).

D'autres moyen tels que le traitement de l'hémophilie B par la transplantation hépatique ont bien sûr été proposés ; les chercheurs ont alors été confrontés aux problèmes du nombre de donneurs de foie, d'histocompatibilité, des causes non immunologiques de dysfonctionnement hépatique, et au risque d'exposer le patient à des agents pathogènes...

.... Restait donc à aller vers une thérapie génique pour l'hémophilie...

6. Les inhibiteurs dans la population hémophile

L'apparition d'anticorps inhibiteurs concerne 10 à 30 % des patients atteints d'hémophilie A sévère. Elle touche 10 fois moins les sujets atteints d'hémophilie B. Sa découverte chez un sujet se fait habituellement dans deux circonstances différentes : soit c'est l'hémophile (ou sa famille) qui remarque que les traitements sont moins efficaces, soit l'anticorps est mis en évidence lors d'examens de laboratoire : ces inhibiteurs, parce qu'ils neutralisent l'activité des facteurs de coagulation transfusés, compliquent le traitement clinique des épisodes de saignements, rendant difficile l'obtention d'une hémostase efficace.

Bien que le problème soit étudié depuis plusieurs années, il est aujourd'hui encore impossible de prévoir quel sujet est à risque de développer des inhibiteurs. Certains **facteurs de risque** sont cependant identifiés. Ils incluent la nature de la mutation du gène, les caractéristiques inhérentes à la réponse immunitaire individuelle, et les circonstances d'exposition aux facteurs de coagulation (45) :

- Le rôle de la mutation sous-jacente a été rendu évident par des études sur des patients suédois, pays où le séquençage du gène touché a eu lieu dans toute la population touchée par l'hémophilie B. Ce séquençage a permis d'observer que le risque à priori de développer des inhibiteurs était de 3% toutes mutations confondues, mais que ce risque variait de façon importante avec le type de mutation : ainsi, alors que ce risque était approximativement nul chez les patients atteints d'une mutation non-sens (en général un seul codon modifié), il touchait 20% des patients présentant une grande perte de séquence codante (délétions, inversions touchant les premiers codons stop...). Ceci aide à expliquer la différence d'incidence des inhibiteurs dans les deux types d'hémophilie : les délétions de larges zones de génome sont en effet rares dans l'hémophilie B, alors qu'au contraire,

l'inversion d'une partie du gène concerne 40% des hémophilies A. Ainsi, l'apparition d'inhibiteurs chez les hémophiles B serait significativement moins fréquente à cause de la plus petite taille du gène codant qui minimise le nombre de délétions...

Le même genre d'étude sur des patients atteints d'hémophilie A, a fourni des informations semblables, à savoir :

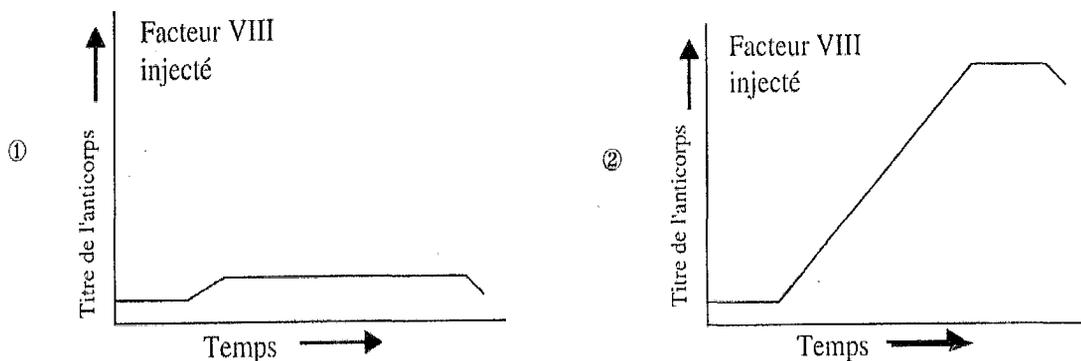
- ceux ayant une inversion terminale du gène développent des inhibiteurs de façon à peu près équivalente à la population contrôle (20% contre 16%),
 - les sujets ayant des mutations non sens, des délétions ou des inversions dans le gène du facteur VIII sont beaucoup plus à risque,
 - ceux porteurs de mutations faux-sens développent rarement des anticorps.
- Les études sur des familles d'hémophiles montrent cependant que ce n'est pas le seul facteur en cause, puisqu'il est très courant qu'un des membres de la famille développe des inhibiteurs alors que les autres membres, probablement touchés par la même mutation, n'en développent pas.
- Enfin, bien que les patients atteints d'hémophilie A sévère soient usuellement les plus touchés par l'apparition à taux élevé de ces inhibiteurs, des études récentes décrivent ce phénomène chez des patients atteints d'hémophilie mineure, la plupart du temps suite à un traumatisme ou à une opération chirurgicale ayant nécessité dans leurs suites l'utilisation plus ou moins prolongée de hautes doses de facteur recombinant.

La **force de l'anticorps** varie d'un individu à l'autre (43) : les anticorps les plus forts et les plus puissants sont dits de **titre élevé**, ceux qui induisent une inhibition plus faible de l'activité anticoagulante sont dits de **faible titre**. Les deux unités les plus utilisées pour définir le titre ont été définies à *Oxford* (Angleterre) et à *Bethesda* (Maryland - USA), d'où leur nom.

A titre indicatif, on considère que les titres faibles sont inférieurs à 20 unités Bethesda, alors que les titres élevés peuvent atteindre plusieurs milliers.

D'un point de vue médical, ce n'est en revanche pas le titre d'anticorps qui compte le plus pour décider de la meilleure stratégie d'aide à une personne, mais le **type de réponse** induite par une perfusion de facteur coagulant. Cette notion prend en compte non seulement la quantité d'anticorps produits mais aussi leur nature. La réponse peut être faible (cas le plus fréquent), le titre d'anticorps n'augmente alors que de quelques unités ; au contraire des "forts répondeurs" pour lesquels l'introduction du facteur déclenche une réponse importante. Il est cependant important de noter qu'un état de "fort répondeur" n'est pas nécessairement permanent ; la réponse peut varier spontanément ou sous l'influence d'un traitement.

Figure 7. Jones P, 1992 (43). Forts et faibles répondeurs.



En ①, il n'existe qu'une "réponse faible" au facteur VIII, avec une élévation modérée (sinon nulle lors de l'apparition de l'anticorps).

La figure en ② montre la réponse d'un sujet "fort répondeur" à la suite d'une stimulation par le facteur VIII.

Dans le cas des sujets faibles répondeurs, le traitement est très simple : la plupart d'entre eux peuvent être traités comme les patients sans anticorps ; le traitement intermittent de substitution ou la prophylaxie à faibles doses induisent la disparition de l'anticorps et l'on peut alors penser que l'organisme a été amené à considérer le facteur comme sien. Les accidents hémorragiques

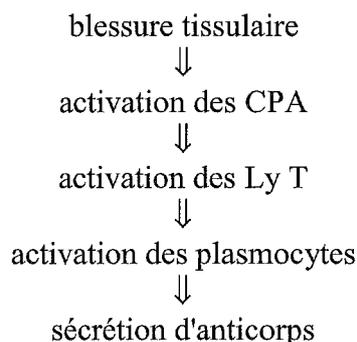
sont traités comme tels lorsqu'ils sont reconnus, à l'occasion une augmentation de la dose de facteur peut être nécessaire.

Dans le cas du sujet fort répondeur, plusieurs approches ont été proposées mais aucune n'a été entièrement couronnée de succès :

- ☆ Traitement par de faibles doses de facteur (à la demande ou en prophylaxie)
- ☆ Traitement par de fortes ou très fortes doses de facteur
- ☆ Traitement par des facteurs d'origine animale
- ☆ Court-circuiter le facteur manquant : mettre en jeu la voie extrinsèque de la coagulation (injection de facteur VIIa par exemple), ou administrer un facteur situé plus loin dans la cascade de la coagulation (le facteur IXa pour les sujets déficients en facteur VIII...)

Si l'on s'intéresse maintenant à la formation des inhibiteurs d'un point de vue immunologique (10, 68, 69), ceci nous renvoie au concept de tolérance et de présentation d'antigène. L'induction des inhibiteurs (ou anticorps dirigés contre les facteurs de coagulation) est promu par les lymphocytes T helper. Ces cellules, lors de leur développement cellulaire, sont normalement rendues inefficaces contre les cellules de l'organisme : elles deviennent tolérantes à ces molécules, les reconnaissant comme faisant partie du même corps. Cependant, alors que chez un sujet normal, les facteurs VIII ou IX sont dès le début reconnus comme des molécules du soi, les individus atteints d'hémophilie n'expriment que peu ou pas ces épitopes (gène défectueux). Injectés lors d'un traitement substitutif, ces épitopes exogènes pourront donc être reconnus comme étrangers par les lymphocytes T matures qui promouvront alors l'apparition d'anticorps. L'activation de ces cellules T se fait via les CPA ou cellules présentant l'antigène. Ces CPA sont chargées de fixer toute molécule étrangère (antigène) et d'aller la présenter aux cellules de défenses. Pour être efficaces elles doivent recevoir un signal d'activation, par

exemple une blessure tissulaire, une réaction inflammatoire faisant suite à une infection bactérienne ou virale banale... Les opérations s'enchaînent donc de la façon suivante :



Etude de l'hémophilie A : étant donné la prévalence des anticorps contre le facteur VIII, SCANDELLA (71) et son équipe ont voulu étudier les épitopes qui servaient de cibles à ces anticorps et qui supportaient le rôle antigénique. Leurs études ont prouvé qu'il y avait deux domaines du facteur VIII pour lesquels l'apparition d'anticorps était fréquente : la région A2 et la région C2 ; la région A3 étant aussi responsable d'un certain nombre de ces apparitions. Pour mieux détailler ces épitopes, les chercheurs ont ensuite comparé les protéines humaines et porcines (le facteur VIII porcin est généralement bien toléré par les sujets présentant des inhibiteurs contre la molécule humaine et est à ce titre utilisé pour leur traitement). Cette étude a montré qu'une simple mutation d'un acide aminé chez le porc réduisait la sensibilité de la molécule aux inhibiteurs monoclonaux sans diminuer l'activité du facteur ; ce résultat pourrait déboucher sur la synthèse de nouvelles formes de facteur VIII moins immunogènes.

PARTIE 2

approche globale de la thérapie génique

-chapitre1-

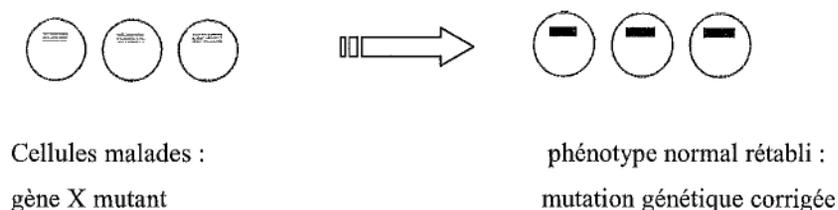
***un nouveau remède
pour l'hémophilie***

1. Qu'est ce que la thérapie génique ?

La thérapie génique est une nouvelle approche de traitement ou de prévention des maladies. Elle utilise les gènes comme médicaments. Il existe deux grands systèmes de thérapie génique (20) :

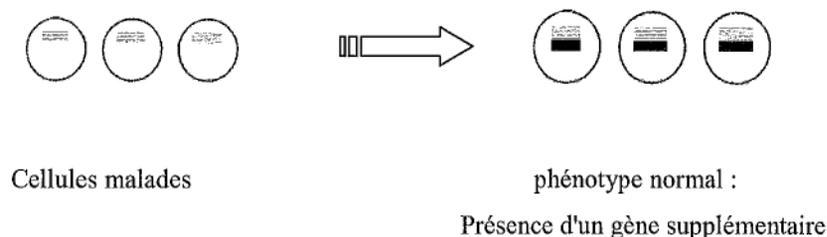
1/ L'approche idéale consisterait à réparer précisément la lésion du gène muté (souvent une seule base) sans modifier le reste du gène. Cette approche demande d'introduire dans la cellule un fragment d'ADN étranger homologue de la partie lésée (mais dans lequel la lésion a été corrigée) et de permettre une recombinaison spécifique de ce fragment au niveau du site lésé. Intéressante en théorie, cette approche pose en pratique des problèmes d'efficacité.

Figure 8. correction ciblée de la mutation du gène



2/ L'autre approche, plus efficace et sur laquelle nous nous attarderons plus, consiste non pas à corriger le gène défectueux, mais à apporter, en supplément et via un vecteur, un gène normal dans les cellules du patient. C'est à partir de ce gène que la protéine manquante (dans notre cas les facteurs VIII et IX) sera synthétisée dans l'organisme.

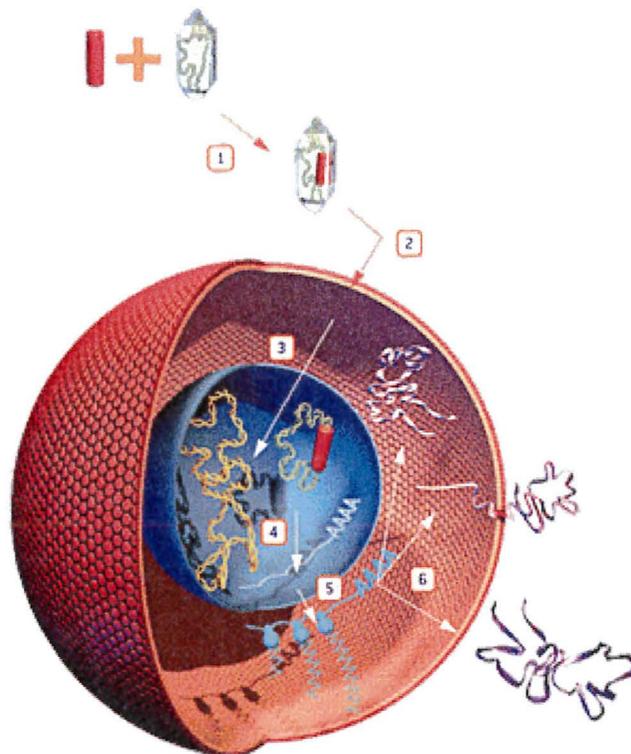
Figure 9. thérapie génique d'augmentation : apport d'un gène supplémentaire



Les meilleurs systèmes d'administration naturels ou vecteurs sont les virus : ces micro-organismes qui ne peuvent exister seuls et survivent en infectant des cellules vivantes, ont en effet développé au cours des années des techniques d'invasion des plus performantes.

Le principe de la thérapie génique est simple : utiliser un vecteur (viral par exemple) dans lequel on aura au préalable introduit un gène thérapeutique, et l'injecter dans un organisme. Les virus vont alors se multiplier et infecter différentes cellules, répandant avec eux le transgène. Si le vecteur peut alors envahir suffisamment de cellules sans que l'organisme envoie des anticorps dirigés contre cet agent étranger, il permettra à cet organisme de fabriquer suffisamment de facteur VIII ou de facteur IX pour prévenir les saignements.

Figure 10. (web8) : Mécanisme simplifié d'une thérapie génique



1. Insertion d'un gène dans un vecteur.
2. Contact vecteur / cellule.
3. Entrée et transport du gène dans le noyau cellulaire.
4. Transcription de l'ARNm à partir du gène.
5. Traduction de l'ARNm en protéine.
6. Sécrétion, fixation membranaire ou expression cytoplasmique de la protéine.

2. Avantages de la thérapie génique

1/ Agir en amont pour prévenir les troubles de la coagulation :

- plus de saignements,
- plus d'inflammations, ni de douleurs liées aux hémorragies,
- plus de complications articulaires...

2/ Limiter le nombre d'injections, permettre une action sur plusieurs années, sur la vie ? :

- amélioration du confort du patient,
- réduction des coûts de traitements.

3/ Diminuer les risques d'infections.

4/ Diminuer l'incidence des anticorps neutralisants en assurant une distribution constante du

facteur : actuellement les patients développant des anticorps sont en effet traités par des injections quotidiennes et à hautes doses du facteur manquant, et ceci amène chez 70 à 90% d'entre eux une disparition des anticorps (43), d'où l'espérance placée en la thérapie génique. Cette idée a aussi fait ses preuves chez la souris immunisée contre le facteur VIII et traitée par vecteur viral codant pour ce facteur (greffe de moelle osseuse) (19) : le nombre d'anticorps diminue brutalement après la greffe.

3. Risques de la thérapie génique

Simple à résumer il ne faut cependant pas les sous estimer : à eux trois ces dangers expliquent une grande partie des doutes et interrogations que soulève la thérapie génique :

(web5)

- 1/ Risque que le virus agisse en tant que tel et agresse l'organisme.
- 2/ Possibilité qu'il stimule le système immunitaire, et empêche ainsi un traitement ultérieur.
- 3/ Risque qu'il perturbe l'expression d'autres gènes, active accidentellement des gènes promoteurs de cancers...

Pour ces raisons, les premiers essais incluront probablement des volontaires âgés, dont des sujets VIH +. Le problème sera alors de distinguer les effets indésirables dus à la thérapie génique des autres changements métaboliques comme ceux induits par le VIH ou les hépatites par exemple.

<p style="text-align: center;">4. Pré-requis pour la thérapie génique : Sûreté et efficacité se résument en 6 points</p>

- 1/ Le gène doit être transféré dans des cellules où il fonctionnera normalement et où son expression sera efficace. Dans le cas de l'hémophilie, le gène doit être introduit dans des cellules capables de délivrer les facteurs VIII ou IX dans la circulation sanguine.
- 2/ Une fois transféré, le gène doit fonctionner pendant une longue durée, de préférence toute la vie. C'est à dire que les cellules transfectées, doivent avoir une longue durée de vie, ou être capables de transmettre ce gène à leurs cellules filles.
- 3/ Le transgène doit être correctement exprimé ; il doit produire assez de facteurs VIII ou IX pour permettre une coagulation normale.
- 4/ Le transfert du gène ne doit pas affecter l'ADN normal du sujet traité (induction de cancer par exemple) : il s'agit d'introduire dans une cellule un facteur manifestant une nouvelle fonction sans que les autres fonctions de la cellule ou d'autres gènes ne soient affectées.
- 5/ le transfert de gène ne doit pas générer de réaction immune qui limiterait l'efficacité du transgène, empêcherait les futurs traitements, ou causerait des effets indésirables trop importants.
- 6/ Le processus de transfert utilisé doit être relativement simple à mettre en œuvre, aisément adaptable à chaque sujet, et doit entraîner la guérison de toutes les personnes traitées.

(web5)

5. l'hémophilie : un modèle pour la thérapie génique ?

Les maladies héréditaires récessives sont conceptuellement les maladies les plus faciles à traiter par thérapie génique car les mutations responsables sont le plus souvent des mutations "perte de fonction".

L'hémophilie est un modèle clinique adéquat pour le développement de la thérapie génique, et présente de nombreux avantages (44, 45) :

- 1/ Il y a une relation de cause à effet, simple et bien définie, entre la déficience protéique et les troubles sanguins.
- 2/ Le gène responsable est connu.
- 3/ On a pu cloner le gène normal et l'introduire dans des vecteurs.
- 4/ Il existe des modèles animaux satisfaisants et bien définis pour les études précliniques : souris génétiquement modifiées, chiens hémophiles.
- 5/ La fenêtre thérapeutique est large : d'une part une élévation même modeste, de l'ordre de 2% des taux de facteurs amènera une amélioration notable du phénotype ; d'autre part, des taux de l'ordre de 150% restent dans la normale et ne seront en conséquence pas dangereux.
- 6/ Une expression tissulaire spécifique et une régulation précise des gènes ne sont pas nécessaires : bien que les facteurs de coagulation soient normalement synthétisés dans le foie, des études ont montré que des facteurs biologiquement actifs pouvaient être synthétisés dans d'autres tissus (muscle, peau, endothélium...), la seule contrainte étant que ces facteurs parviennent dans la circulation sanguine, et ce sous forme active.
- 7/ Une production efficace de protéine a pu être obtenue dans les essais cliniques

-chapitre 2-

***thérapie génique
appliquée
à l'hémophilie :
généralités***

Technologie de la thérapie génique

Les deux conditions nécessaires à la thérapie génique sont :

- la disponibilité du gène thérapeutique (gènes codant pour les facteurs VIII et IX),
- l'existence de moyens permettant sa délivrance dans des cellules capables de l'exprimer et de sécréter la protéine correspondante sous une forme fonctionnellement active.

La première condition est déjà remplie : les gènes des facteurs VIII et IX sont en effet identifiés, cartographiés, clonés. Ils sont d'ailleurs déjà utilisés à but thérapeutique pour la production des facteurs de coagulation dits "recombinants" qui constituent à l'heure actuelle le traitement de bien des hémophiles.

Le choix d'un **système assurant la délivrance** de ces gènes reste par contre à faire. Dans ce but, différents types de vecteurs (expériences *in vitro* et *in vivo*) ont été employés et ce dans des types cellulaires variés. Ont ainsi été testés pour l'instant :

- les vecteurs viraux dérivés des rétrovirus, des adénovirus, des AAV (virus adéno-associés) et des lentivirus,
- ainsi que les vecteurs non viraux comme l'ADN nu, les chimères ADN/ARN, les complexes protéines/ADN et les ADN encapsulés dans des liposomes.

Le foie, lieu normal de production des deux facteurs de coagulation, assurant toutes les modifications post-transcriptionnelles nécessaires, est logiquement devenu l'un des **tissus cibles** privilégié de la thérapie génique appliquée à l'hémophilie. D'autres tissus tels que ceux dérivés des myoblastes, fibroblastes, kératinocytes, cellules endothéliales des capillaires et cellules du système hématopoïétique ont aussi été testés, avec plus ou moins de succès...

1. Principes des méthodes *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*

Les techniques de thérapie génique se divisent en trois groupes : méthodes *in vitro*, méthodes *ex vivo* et méthodes *in vivo*. Cette division se base sur le fait que l'introduction d'un gène dans l'organisme ou dans une cellule peut se faire de deux façons : directement ou indirectement.

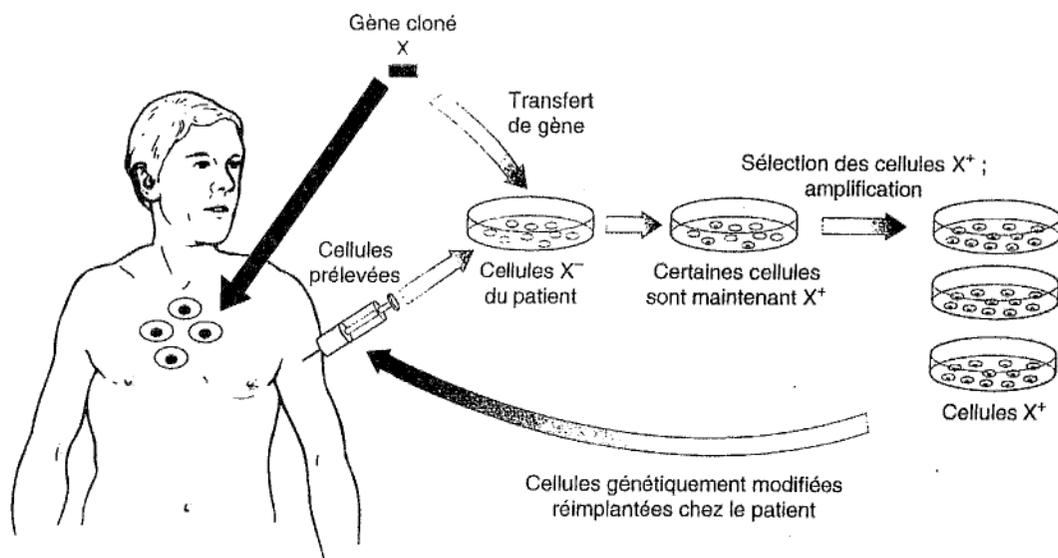
1.1/ Transfert de gène *in vitro* :

Il consiste tout simplement, dans un milieu de culture, à transférer par différents artifices, un gène cloné à des cellules dépourvues de ce gène. Ceci constitue en fait la première étape pour une thérapie génique *ex vivo*.

1.2/ Transfert de gènes *ex vivo* et *in vivo* :

1.2.1/ mécanisme

Figure 11. Strachan T, 1998 (76) : thérapie génique *in vivo* et *ex vivo*



La thérapie génique *in vivo* (flèche noire), comporte la modification génétique des cellules d'un patient *in situ*. Au contraire, dans la thérapie *ex vivo* (flèches claires), les cellules sont modifiées à l'extérieur de l'organisme avant d'être réimplantées chez le patient. La figure représente la situation dans laquelle les cellules autologues sont utilisées (voir texte).

1.2.2/ Transfert de gènes *ex vivo* :

Le processus de transfert de gène se déroule dans ce cas à l'extérieur de l'organisme.

Les cellules génétiquement modifiées ainsi obtenues sont ensuite greffées au sujet.

☆ transfert *ex vivo* avec emploi de cellules autologues :

Le patient reçoit par greffe ses propres cellules. Il est à la fois donneur et receveur.

Les opérations se déroulent ainsi :

1/ Recueil de cellules chez le patient à traiter et mise en culture.

2/ Transfert du gène cloné aux cellules en culture. Les cellules qui ont subi avec succès cette transformation sont sélectionnées et multipliées par culture *in vitro*.

3/ Réintroduction des cellules chez le même individu (la greffe de cellules autologues empêche le phénomène de rejet).

Cette approche *ex vivo* n'est évidemment applicable qu'aux tissus qui peuvent être extraits de l'organisme, modifiés génétiquement puis remis en place dans l'organisme du patient où une fois greffés ils pourront survivre pendant une longue période (c'est le cas des cellules du système hématopoïétique, de la peau...).

Elle impose des manipulations génétiques spécifiques à chaque patient, avec mise en culture de ses propres cellules... et pose donc des problèmes de coût économique. Pour cette raison d'autres approches sont étudiées : la thérapie *in vivo* sur laquelle nous reviendrons plus tard et la thérapie *ex vivo* mais utilisant des cellules somatiques non autologues (paragraphe ci-dessous).

☆ transfert *ex vivo* avec emploi de cellules non autologues

Cette dernière approche consiste à utiliser un clone cellulaire génétiquement modifié et à enfermer ces cellules (avant leur implantation à l'homme) dans des systèmes enveloppants les protégeant des réponses immunes de l'organisme.

La taille des pores du système enveloppant limite le rejet de la greffe : elle est en effet conçue afin que ces systèmes encapsulés soient :

- Inaccessibles aux produits de haut poids moléculaire comme les médiateurs immuns (complément et lymphocytes T cytotoxiques) ; la même lignée cellulaire peut ainsi être utilisée pour de multiples patients.
- Perméables aux molécules de plus faibles tailles telles que les produits du transgène (facteur VIII et IX) et les nutriments.

1.2.3/ Transfert de gènes *in vivo* :

Les gènes clonés sont ici injectés directement dans l'organisme. Le processus de transfert de gène s'effectue donc dans le corps même du patient, après que le transgène soit parvenu à intégrer les cellules cibles adéquates.

Dans la mesure où il n'y a aucun moyen de sélectionner et d'amplifier les cellules qui ont intégré le transgène, le succès de cette approche dépend de façon cruciale de l'efficacité générale du transfert et de l'expression du gène.

Par rapport au transfert *ex vivo*, cette approche a l'avantage d'être moins chère (car adaptée non pas à l'individu mais à toute la population), plus simple (pas de culture de cellules, pas de greffe...), et en pratique plus efficace. Cependant elle ne permet pas comme sa concurrente de vérifier que les cellules ciblées contiennent bien le gène cloné, ni que celui-ci ait été inséré sans activer de pro-oncogène ...

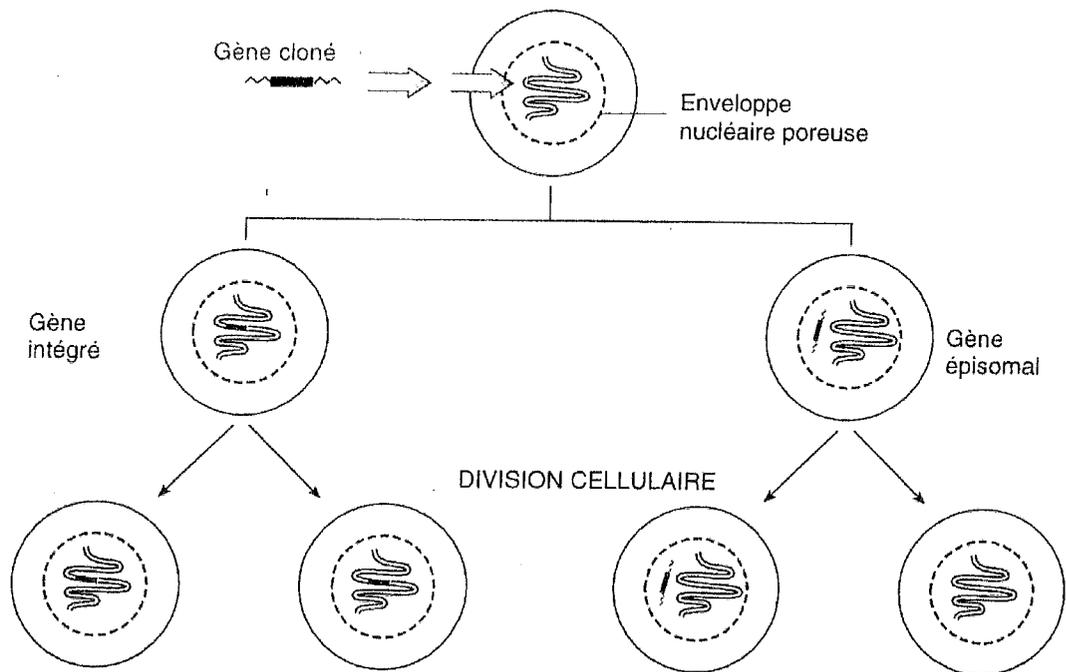
Les deux techniques ont donc leurs avantages, même si les méthodes *in vivo* suscitent de plus en plus d'intérêt au fur et à mesure de l'avancée des connaissances.

Un autre aspect important en thérapie génique est la façon dont le gène une fois inséré dans les cellules va s'intégrer ou non au chromosome hôte :

2. Intégration du gène au chromosome hôte

Les gènes exogènes qui s'intègrent dans les chromosomes peuvent être transmis de façon stable à toutes les cellules filles, ce qui n'est pas le cas pour les gènes qui persistent sous forme extra-chromosomique (gènes épisomaux) :

Figure 12. Strachan T, 1998 (76) : devenir du gène transféré dans des cellules nucléées.



Deux devenirs sont possibles :

Si les cellules sont en division active, tous les gènes qui s'intègrent de façon stable dans l'ADN chromosomique seront répliqués avec le chromosome parental (au cours de la phase S du cycle cellulaire). Après chaque division cellulaire, un gène intégré sera hérité de façon stable par les deux cellules filles. Par conséquent, toutes les cellules descendant d'une même cellule dans laquelle une intégration stable sera survenue contiendront le gène intégré, permettant ainsi une expression stable, continue, du gène transféré et la possibilité d'un traitement permanent.

Au contraire, les gènes épisomaux qui ne s'intègrent pas mais qui se répliquent de façon extrachromosomique (sous le contrôle d'une origine de réplication présente dans le vecteur) peuvent ne pas être transmis à toutes les cellules filles au cours des mitoses ultérieures. Par conséquent, ce type d'approche est particulièrement adapté à la thérapie génique des cellules qui ne se divisent pas.

2.1/ Gène intégré au chromosome (cas des rétrovirus) :

L'avantage de l'intégration chromosomique réside dans le fait que le gène peut être transmis de façon stable lors de la division cellulaire. Les cellules filles contenant alors également le gène introduit, une expression stable et à long terme peut être obtenue.

Dans le cas de tissus composés de cellules se divisant activement, le ciblage des cellules souches peut être une possibilité intéressante : celles-ci constituent en effet une population immortelle de cellule d'où dérivent toutes les autres cellules du tissu ; de plus, elles ne donnent pas seulement naissance aux cellules matures, mais renouvellent également le compartiment souche.

Ce mode d'intégration est pourtant quelquefois délaissé par les chercheurs pour une seule raison : mis à part le cas des AAV, on ne contrôle pas le site d'intégration du transgène ; son insertion dans le chromosome hôte est le plus souvent hasardeuse

Ce simple phénomène est responsable des problèmes suivants :

- la localisation du gène inséré peut varier énormément d'une cellule à l'autre,
- si elle se situe au niveau d'une région d'hétérochromatine hautement condensée, l'intégration du gène ne sera pas suivie de son expression,
- l'événement d'intégration entraîne quelques fois la mort de la cellule hôte (insertion dans un gène crucial, entraînant son inactivation) ou sa prolifération incontrôlée (activation d'un oncogène ou inactivation d'un gène suppresseur de tumeur).

Ces inconvénients peuvent toutefois être palliés par l'usage d'une thérapie *ex vivo* puisque cette méthode offre la possibilité de sélectionner les cellules dans lesquelles l'intégration est efficace et d'en vérifier le phénotype après mise en culture (recherche de signe de transformation néoplasique évidents), avant de les retransférer au patient.

2.2/ Gène extra chromosomique (cas des adénovirus) :

Certains systèmes de transfert de gènes vont eux introduire le gène dans les cellules sans qu'il ne soit intégré au chromosome. Le gène persiste alors sous forme d'élément extrachromosomique. Il peut être exprimé à haut niveau. Il faut cependant compter sur le fait que dans le cas des cellules en division active, le gène introduit ne pourra se ségréguer de façon égale entre les cellules filles et sera donc incapable d'assurer la persistance d'une copie du transgène dans chaque cellule fille. L'expression à long terme peut alors être compromise et le traitement des maladies génétiques nécessiter de répéter régulièrement ces transferts de gènes.

2.3/ Caractéristiques de l'intégration pour différents vecteurs viraux :

tableau 3. Strachan T, 1998, (76).

Vecteur utilisé	Efficacité du transfert de gènes	Efficacité de l'intégration
adénovirus	élevée	Basse (= gène épisomal)
rétrovirus	élevée	élevée
AAV	élevée	élevée

Pour plus de précision se rapporter aux sections "rétrovirus", "adénovirus", "AAV" de la partie "trouver le bon vecteur"

Matériels et méthodes

Ce chapitre n'a pas le but d'expliquer le détail des méthodes utilisées par les chercheurs, mais simplement de donner les notions nécessaires pour permettre la compréhension des expériences exploitées par la suite dans ce document.

Seront donc présentés ici :

- les principales méthodes d'évaluation des résultats (avec leur nom anglais),
- les modèles animaux utilisés dans les diverses études et leurs caractéristiques,
- les tissus pouvant servir de cible pour recevoir les transgènes,
- un récapitulatif des caractéristiques principales des différents vecteurs viraux.

Ce récapitulatif sera détaillé dans le sous chapitre suivant.

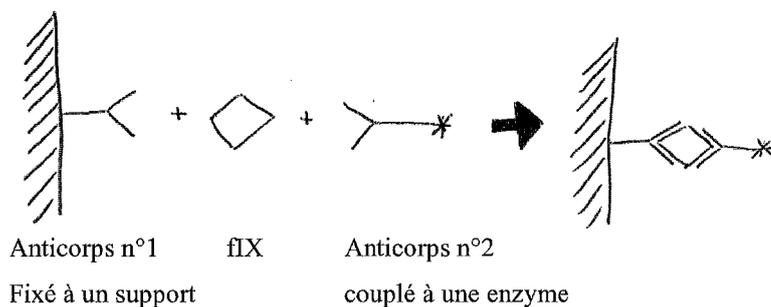
1. principales méthodes d'évaluation des résultats

Les échantillons de sang prélevés pour analyse des résultats et exploration de la coagulation sont obtenus par ponction veineuse et recueillis dans un tube contenant du citrate de sodium (chélateur du calcium, dont l'utilisation prévient la coagulation du sang).

Ils sont ensuite centrifugés de façon à obtenir un plasma riche en plaquettes ou dépourvu de plaquettes, selon les nécessités des techniques utilisées, puis si besoin réfrigérés (conservation aux alentours de -70 à -80°C) ; les examens de coagulation doivent être effectués le plus rapidement possible après le prélèvement (au delà de 4 heures la diminution des protéines labiles, comme le facteur VIII, peut s'observer et fausser l'interprétation des résultats).

Les taux de facteurs (en ng/ml pour le facteur VIII et en µg/ml pour le facteur IX) sont habituellement mesurés par une technique enzymatique de type ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (méthode de dosage immuno-enzymatique, très sensible, en phase hétérogène, nécessitant de très faibles quantités de plasma) (9, 37, 46).

Figure 13. Technique ELISA appliquée au dosage du facteur VIII :



Par exemple : premier Anticorps = anticorps polyclonal contre le facteur IX humain

Deuxième anticorps = est couplé à une peroxydase.

L'adjonction du substrat de l'enzyme donne alors un produit coloré visible à l'œil nu ou au spectrophotomètre.

Pour le dosage des protéines humaines, le facteur recombinant (institut Genetics par exemple) sert de référence pour établir une courbe standard d'étalonnage. La technique mesure uniquement le facteur humain, les taux initiaux de facteurs murins et canins ne sont donc pas pris en compte. Dans le cas des protéines canines, les facteurs recombinants n'étant pas disponibles, on utilise les facteurs purifiés (les gènes codant pour les protéines murines ne sont quant à eux pas encore au point).

La correction du phénotype peut être évaluée par différents paramètres (voir ci-dessous) :

Les plus utilisés sont : - chez la souris : aPTT et Tail clipping,

- chez le chien : WBCT, aPTT et CBT.

☆ **ACT : Activated Clotting Time : test *in vitro*, employé sur le modèle canin (14) :**

2 ml de sang sont prélevés dans un tube pour ACT préchauffé à 37°C et contenant 10 à 15 mg de silice. L'échantillon est ensuite mélangé en retournant 5 fois le tube. Après une minute d'incubation à 37°, on le retire du bloc chauffant toutes les 15 secondes pour noter l'apparition du premier caillot. L'ACT est normalement inférieur à 2 minutes chez le chien ; il peut aller jusqu'à 4 minutes chez le chien hémophile.

☆ **aPTT: Activated Partial Thromboplastin Time, aussi nommé Temps de Céphaline**

+ activateur ou TCA : test *in vitro* (14, 37, 82) :

Les échantillons de sang déplaquetés sont collectés dans des tubes (préchauffés à 37°C) contenant du citrate de sodium. Pour 100µL de plasma ainsi obtenu on rajoute 100 µL de céphaline (substitut des phospholipides procoagulants des plaquettes activées) avec un activateur (kaolin ou silicates qui activent fortement la phase contact et augmentent la reproductibilité du test). On chauffe l'ensemble pendant 3 minutes ; puis on additionne du chlorure de calcium afin d'initier la réaction et on mesure à partir de là l'initialisation de la coagulation (usage d'un fibromètre et comparaison à un plasma de référence).

L'aPTT normal est d'environ 60 secondes chez la souris ; il peut aller jusqu'à 120 secondes chez la souris hémophile (80).

Chez le chien normal il est usuellement compris entre 14 et 18 secondes ; il peut s'élever jusqu'à 80 secondes chez le chien hémophile (36, 37).

☆ **PTT : non activated Partial Thromboplastin Time (8, 46, 48) :**

Méthode plus ancienne que l' aPTT, similaire mais sans activateur.

Les substituts plaquettaires utilisés sont divers : extraits chloroformiques de cerveau (= thromboplastine diluée) ou autres fractions de céphaline brute. Ces substituts ne sont que des thromboplastines "partielles" et sont incapables d'activer la voie extrinsèque qui nécessite pour cela la thromboplastine tissulaire complète (= facteur tissulaire concentré). L'activation de la phase contact est, dans cette méthode, induite par la paroi du tube de verre.

Les normales chez le chien sont comprises entre 42 et 50 secondes, les chiens hémophiles ayant des valeurs généralement comprises entre 150 et plus de 300 secondes.

☆ **WBCT : Whole Blood Coagulation Time, test *in vitro*, utilisé pour les modèles canins :**

Déterminé sur du sang total, à une température de 28°C par la méthode à 2 tubes. Les tubes couverts de silicone (+ activateur kaolin) sont sortis toutes les 30 secondes jusqu'à formation d'un caillot. (37, 48).

Le WBCT est normalement de 6 à 8 minutes chez le chien non hémophile ; il est supérieur à 60 minutes chez le chien hémophile.

☆ **CBT: Cuticle Bleeding Time : test *in vivo***

Après une légère anesthésie, les animaux sont placés en position supine et subissent une "légère coupure" de la queue (entaille pour les chien, section transversale ayant en général un 1,5mm de diamètre pour la souris).

Selon les expériences, le résultat est interprété :

- soit par l'application d'un papier filtre sur la blessure toutes les 30 secondes (sans abîmer le caillot en formation),
- soit par mesure du volume total de sang recueilli pendant un intervalle de temps donné dans un tube à essai placé sous la queue de l'animal.

Le temps nécessaire à la coagulation est normalement de :

- 2 à 8 minutes chez le chien non hémophile, supérieur à 20 minutes chez le chien hémophile (30),
- 3 à 5 minutes chez la souris non hémophile, supérieur à 30 minutes chez la souris hémophile (51, 89).

L'expérience est usuellement arrêtée avant le temps fixé si les animaux perdent trop de sang (chez la souris hémophile par exemple, la blessure est cautérisée quand la perte de sang devient supérieure à 300 μ l).

☆ **Tail clipping : test *in vivo*, pratiqué uniquement sur la souris (14)** : après coupure plus importante de la queue de l'animal (coupure d'une longueur de 2cm), on regarde si au bout de 24h celui-ci est toujours vivant. Plus "barbare" mais aussi admis par les comités d'éthique animale, ce test montre un certain intérêt chez les modèles de souris déficientes en facteur VIII pour lesquelles il est le seul moyen sûr de détermination du phénotype.

L'activité spécifique ou activité biologique du facteur synthétisé peut être comparé à celle de la protéine pure :

Pour le facteur VIII, elle est en général estimée par essai chromogénique (14).

Cet essai mesure en fait le temps nécessaire à l'activation du facteur X en facteur Xa, en posant comme unité 1U = activité du facteur contenu dans 1ml de plasma humain normal = 100 à 200ng/ml. La mesure se fait en parallèle avec celle d'un échantillon humain normal de plasma utilisé pour construire la courbe de référence.

Pour le facteur IX, l'activité est habituellement estimée par un essai de coagulation en une étape (Clotting Activity ou CA, mesuré par exemple par aPTT), le temps de coagulation étant comparé à celui d'un plasma de référence normal. L'activité spécifique est alors déterminée par le rapport entre ce CA et les taux de facteurs évalués par ELISA. (2, 6, 54, 86)

Les inhibiteurs sont généralement mesurés par un **essai Bethesda en une étape** (54).

Des dilutions variables du plasma à analyser sont additionnées à du plasma humain normal dans un ratio de 1/1, puis incubés à 37°C pendant 2 heures. Le temps de coagulation est ensuite mesuré par un essai aPTT. La dilution diminuant de 50% l'activité coagulante est utilisée pour calculer le taux d'inhibiteurs : une unité bethesda/ml = taux de plasma à tester diminuant de 50% l'activité résiduelle du facteur.

Une **méthode ELISA ou Western Blot** peut aussi être employée pour mesurer les anticorps contre la protéine humaine.

La toxicité hépatique des vecteurs est estimée par mesure des taux enzymatiques des phosphatases alcalines, ASAT et ALAT, des biopsies peuvent aussi être réalisées.

Tableau 4. Récapitulatif des principales valeurs moyennes obtenues par différents tests de coagulation.

	Souris		chien	
	normale	hémophile	normal	hémophile
ACT	/	/	< 2 min.	Jusqu'à 4 min.
aPTT	Environ 60 sec.	Jusqu'à 120 sec.	14 à 18 sec.	Jusqu'à 80 sec.
PTT	/	/	42 à 50 sec.	> 150 sec.
WBCT	/	/	6 à 8 min.	> 60 min.
CBT	3 à 5 min.	> 30 min.	2 à 8 min.	> 20 min.
Tail clipping	Vivant après 24h	Mort après 24h	/	/

2. Animaux utilisés dans les expérimentations

2.1/ Modèles d'animaux hémophiles (Knockout)

2.1.1 Hémophilie B :

☆ **plusieurs colonies de chiens hémophiles**

Leur phénotype correspond à celui d'une hémophilie sévère (33).

Les taux plasmatiques de facteur IX mesurés sont inférieurs à 1%.

☆ **3 modèles de souris hémophiles (1997)**

Ces souris ont un taux de facteur IX actif détecté de l'ordre de 6% (aPTT assay), pour l'instant attribué à un artéfact lors des dosages. Elles ont en effet un phénotype équivalent à celui des patients hémophiles sévères (53, 82) et présentent des saignements spontanés, notamment au niveau des pattes. La plupart du temps ces saignements sont sous-cutanés ou musculaires mais des hémorragies intracrâniennes, et des régions axillaires et inguinales... ont aussi été observées. Elles survivent si elles ne subissent pas d'agressions (certaines souris meurent suite à des hémorragies internes survenues lors de combats avec d'autres animaux présents dans la même cage).

Une coupure de la queue de ces souris entraîne des saignements importants suivis de la mort de l'animal.

2.1.2 hémophilie A :

☆ **plusieurs modèles de chiens hémophiles, certains connus depuis plus de 50 ans (14, 30)**

☆ **2 modèles de souris hémophiles (1995-1996)**

Ces souris ont un taux de facteur VIII actif inférieur à 1%.

Curieusement, alors qu'on pourrait s'attendre à avoir des animaux hémophiles sévères, leur phénotype correspond à celui de patients hémophiles modérés. Les souris les plus âgées ont plus de 1 an, elles sont en bonne santé, sans saignements spontanés, ni diminution de leur activité physique. Les femelles hémophiles (xx) survivent à la mise bas. On remarque seulement un temps de saignement excessif lorsqu'on leur coupe un morceau de queue (tail clipping) : environ 2/3 des animaux meurent dans les 2 heures suivant cette coupure.

Ce phénotype suggère qu'il y a peut être chez la souris un facteur alternatif au facteur VIII comme cofacteur du facteur IX, ou une autre voie assurant la coagulation même en l'absence de facteur VIII (excepté dans les cas extrêmes comme la coupure de la queue).

2.2/ Autres animaux non hémophiles mais utilisés dans les expériences :

☆ Souris, avec entre autres comme principales souches :

- Souris C57/Bl6 : souris produisant relativement peu d'anticorps contre les facteurs de coagulation humain, au moins lorsqu'ils sont administrés par voie IV
- Souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) = souris immunodéficientes
- Souris Nude : souris immunodéficientes : sans thymus

☆ Chiens

☆ Lapins

☆ Macaques

2.3/ caractéristiques biologiques des différents modèles :

Facteur VIII : chez l'homme : Taux thérapeutique : 5% soit 50mU/ml

Activité spécifique : 5000 U/mg

Taux normal : 1000 mU/ml ou 200 ng/ml

Pour les animaux, la protéine pure de référence n'existant pas, l'activité des protéines (fVIII et fIX) n'est pas encore évaluée. Les quantités présentes (fVIII) chez les modèles normaux sont, elles, évaluées à 5000 mU/ml chez le chien, et à 2500 mU/ml chez la souris C57/Bl6 ; c'est à dire qu'une même quantité de plasma canin se montre 5 fois plus active que l'équivalent humain.

Facteur IX : chez l'homme : Taux thérapeutique : 5% soit 50 mU/ml

Activité spécifique : 200 U/mg

Taux normal : 1000 mU/ml ou 5 µg/ml

Pour la souris, il semble qu'une même quantité de plasma murin soit 3 fois moins active que le plasma humain (73) ; les taux normaux sont donc évalués à 330 mU/ml. Pour le chien ils sont estimés à 1000 mU/ml soit 11.5 µg/ml (le facteur IX canin est 2 fois moins actif que le facteur IX humain).

Tableau 5. Lozier, 1999 (59) : structure du facteur IX selon les espèces :

espèce	Région de comparaison	Identité %
homme	Précurseur complet, 461 AA	100
Macaque rhésus	Précurseur complet, 461 AA	97
chien	Précurseur complet, 452 AA	86
souris	Précurseur complet, 448 AA	83
bœuf	Précurseur complet, 415 AA	84

Nota : je n'ai pu trouver de telles informations pour le facteur VIII, notons simplement que concernant les domaines fonctionnels importants (A et C), on retrouve 84 à 93% d'homologie entre la souris et l'homme (68).

3. Principaux tissus pouvant être ciblés dans les expériences

En thérapie génique classique, les gènes doivent être introduits et exprimés dans les cellules du patient afin de traiter la maladie. Ceci impose en pratique le ciblage des cellules des tissus atteints. On peut cependant dans certains cas cibler délibérément d'autres tissus : par exemple, les gènes peuvent être ciblés initialement vers un type de tissu, tandis que les produits du gène peuvent être libérés à distance.

L'utilisation de ces tissus autres suppose qu'ils remplissent un certain nombre de conditions :

- 1/ être facilement accessibles pour une approche *in vivo* ou *ex vivo*,
 - 2/ permettre une transduction efficace du vecteur,
 - 3/ assurer une synthèse, au taux désiré, de la protéine thérapeutique ,
 - 4/ posséder le matériel enzymatique nécessaire aux modifications co- ou post-traductionnelles nécessaires à la fonctionnalité des protéines thérapeutiques ,
 - 5/ assurer efficacement le transfert de cette protéine dans la circulation systémique,
 - 6/ que la production de cette protéine n'engendre pas de dégâts contre le tissu cible .
- ou les tissus voisins

Ces conditions sont à évaluer soigneusement, le tissu cible étant choisi en fonction des besoins thérapeutiques et du vecteur envisagé. Ainsi dans le domaine de l'hémophilie, les tissus visés sont d'origine :

- hépatique : hépatocytes (7, 11,13, 23, 46, 51, 63, 73)
- musculaire : myoblastes, myocytes (15, 34, 37, 40, 49, 86)
- cutanée : fibroblastes (2, 66, 72, 89) et kératinocytes (28, 84)
- moelle osseuse (19, 38)

⇒ **foie** :

- Constitue le lieu normal de synthèse des facteurs VIII et IX. On peut donc être sûr qu'il est capable de réaliser une synthèse de facteur actif (ayant subi les modifications post-traductionnelles nécessaires à leur activité) et d'assurer son passage dans la circulation sanguine.
- Est composé de cellules en division lente.
- Peut être atteint *in vivo* par voie intraportale ou intraveineuse simple.
- Se révèle en pratique difficile à utiliser ; d'autres tissus ont donc été étudiés pour servir de cibles potentielles aux différents vecteurs (voir ci-dessous).

⇒ **muscle** :

- Myocytes = cellules en division lente.
- Pas utilisées pour le facteur VIII (passage insuffisant de cette protéine trop volumineuse dans la circulation sanguine).
- Ces cellules représentent 40% du poids du corps, sont facilement accessibles, faciles à manipuler *in vitro* et *in vivo*, et permettent un taux de transfection important (sécurité d'emploi prouvée par des essais d'utilisation dans la myopathie de Duchenne).
- Elles ont de plus l'avantage de présenter une durée de vie longue (*in vivo* plus de 60% des cellules transplantées sont encore vivantes après 6 mois) de pouvoir produire des taux importants de facteurs VIII ou IX et d'être bien vascularisées.
- En fait dans les expériences *ex vivo*, ce ne sont pas directement les cellules musculaires qui sont utilisées mais leurs précurseurs ou myoblastes primaires préalablement génétiquement modifiés ; bien qu'il y ait par la suite formation de myotubes par fusion de ces myoblastes, l'expression du transgène n'en est pas affectée.

Les myoblastes sont des cellules en division rapide (contrairement aux myocytes du tissu musculaire).

⇒ **fibroblastes** (derme) : ces cellules sont faciles à prélever, relativement aisées à manipuler et se cultivent bien. Elles ne se différencient pas *in vivo* (donc moins de risque d'inactivation du transgène) et sécrètent une fois modifiées des quantités importantes de protéine thérapeutique. Les processus de transplantation sont efficaces mais ces cellules sont malheureusement dotées d'une durée de vie relativement courte (*in vivo* : moins de 50% des cellules transplantées sont encore vivantes après 80 jours) et assurent un transport peu important des protéines dans la circulation sanguine.

⇒ **kératinocytes** (épiderme) : leur intérêt réside essentiellement dans leur facilité de prélèvement (ils sont encore plus en surface que les fibroblastes). Des techniques récentes permettent aujourd'hui d'envisager leur culture *ex vivo* et une greffe efficace : le greffon peut ainsi subsister plus de 1 an *in vivo*.

Les inconvénients potentiels des kératinocytes résident dans les faits suivants : ils se différencient *in vivo* (donc risque d'inactivation du transgène), et se situent plus loin du flux sanguin que les fibroblastes (donc risque que le facteur ne soit pas efficacement sécrété dans la circulation ; les essais sur le facteur IX, protéine plus petite que le facteur VIII, tendent pourtant à prouver le contraire).

⇒ **moelle osseuse** : les cellules circulant dans le sang n'auront aucun problème à assurer la diffusion du produit du transgène dans le courant sanguin.

Des études ont montré pour tous ces tissus qu'ils pouvaient être infectés *in vitro* par des vecteurs viraux et exprimer le transgène, que le produit de ce transgène pouvait subir les modifications nécessaires à son activité et être sécrété hors de la cellule.

4. Principales caractéristiques des différents vecteurs viraux à la disposition des chercheurs

Tableau 6. D'après (78), (web6)

famille	rétrovirus	adénovirus	AAV
Taille maximale insert	8kb	30kb	4.8kb
Cellules cibles	Seulement en division active	En division active ou ne se divisant pas	En division , ou probablement ne se divisant pas
Ciblage cellulaire	aucun	possible	aucun
Efficacité du transfert de gène	élevée	élevée	élevée
Intégration: Mécanisme: Efficacité:	oui Au hasard élevée	non Episomale basse	possible Chr 19 élevée
Taux d'expression du gène thérapeutique	modéré	élevé	modéré
Durée d'expression	courte	courte	prolongée
Immunité pré-existante chez l'homme	non	oui	oui
Réponse immune	faible	Très forte	faible
Risques	Intégration probablement mutagène	Réactions inflammatoires et immunitaires	(Intégration probablement mutagène)
Recombinaison chez l'hôte : (a) avec l'hôte (b) avec le virus parent	(a) improbable (b) impossible	(a) possible (b) possible	(a) improbable (b) possible
Production	Très difficile	Un peu difficile	Très difficile
Contrôle qualité	Difficile	Assez difficile	Difficile

Vecteurs utilisés

Nous avons vu que l'apport d'un gène aux cellules du patient fait appel à l'utilisation d'un vecteur, viral le plus souvent, ou non viral. Le choix de ce vecteur est en fait un facteur limitant très important pour toutes les méthodes de thérapie génique. Il se fait en fonction même des besoins de cette thérapie. Ainsi, si l'expression du gène n'est nécessaire que pendant une courte période (cf. expression d'une protéine toxique dans les cellules cancéreuses), le vecteur idéal sera l'adénovirus. Mais si une expression prolongée est nécessaire (comme dans la plupart des maladies génétiques), le mieux sera alors un vecteur permettant l'intégration du gène sans engendrer de problèmes immunologiques.

Un vecteur idéal devrait avoir dans ce cas certaines propriétés :

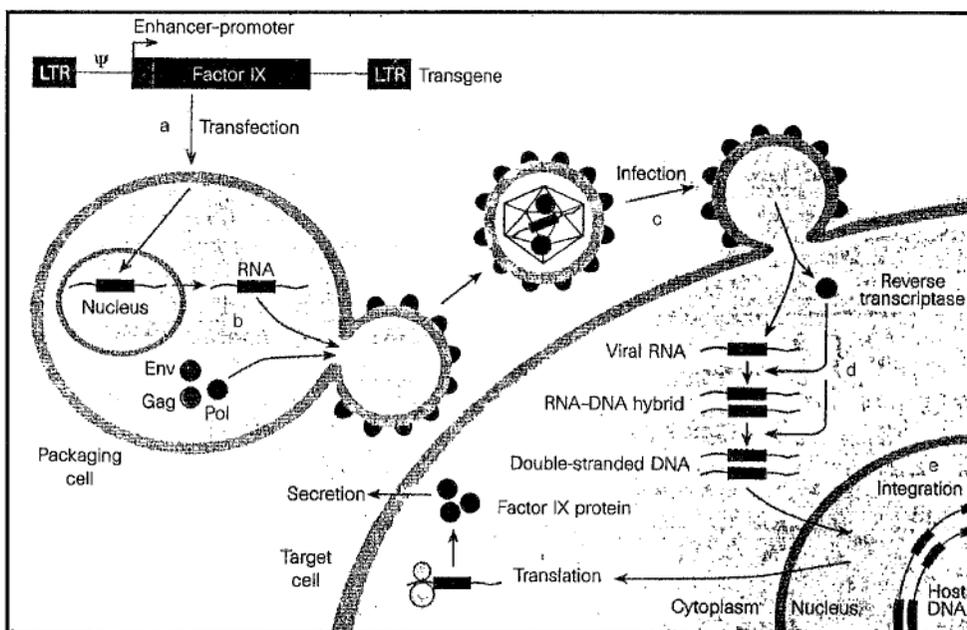
- être produit à des taux élevés ($>10^8$ particules virales/ml de solution transfectante) permettant l'infection d'un nombre important de cellules.
- Par des techniques de production convenables et reproductibles.
- être efficace non seulement *in vitro* mais aussi *in vivo*.
- pouvoir s'intégrer à un site spécifique du chromosome hôte, ou être maintenu sous une forme épisomale stable et permettre la synthèse pendant un temps suffisamment long d'une quantité suffisante de protéine.
- avoir une unité de transcription permettant la manipulation des éléments régulateurs.
- être capable d'infecter les cellules désirées.
- ne pas avoir de composé induisant une réponse immune.

Bien sûr, aucun vecteur n'a toutes ces qualités, mais elles existent toutes individuellement dans différents types de vecteurs. Les plus utilisés en pratique sont les vecteurs viraux. Dans le domaine de l'hémophilie on fait jusqu'à présent appel à trois groupes de virus : les rétrovirus, les adénovirus et les virus adéno-associés (AAV ou Adéno-Associated-Virus).

1. Famille des Rétrovirus :

Les rétrovirus (web6, 76, 78) sont des virus enveloppés, à ARN simple brin. Ils possèdent une transcriptase inverse leur permettant de synthétiser un ADN correspondant bicaténaire capable de s'intégrer dans l'ADN chromosomique et assurent un transfert très efficace de leur ADN dans les cellules hôtes. L'intégration de l'ADN viral se fait alors habituellement au niveau d'un site chromosomique unique, l'ADN intégré pouvant être transféré de façon stable aux cellules filles, offrant la possibilité de traiter une maladie de façon permanente.

Figure 14. Verma IM, 1997 (78) : infection d'une cellule par un rétrovirus transgénique



Pour créer les vecteurs rétroviraux employés en thérapie génique, leur cycle naturel de réplication est exploité :

(a) Le transgène (dans ce cas les facteurs VIII ou IX) est intégré dans une cellule "packaging" exprimant les gènes nécessaires à l'intégration virale (*gag*, *pol* et *env*). (b) Il est ensuite incorporé dans le génome, traduit en ARN et incorporé dans le rétrovirus néosynthétisé par la cellule "packaging". (c) le contenu viral se déverse dans la cellule hôte suite à son infection : la membrane virale fusionne avec la membrane de la cellule cible, permettant le déversement de l'ARN transgénique. (d) la transcriptase reverse (enzyme apportée par le virus) convertit l'ARN en un hybride ADN/ARN puis en ADN double brin. (e) Cet ADN double brin va s'intégrer dans le génome hôte, puis être transcrit par la cellule en ARN, afin de synthétiser la protéine transgénique, dans notre cas les facteurs VIII ou IX.

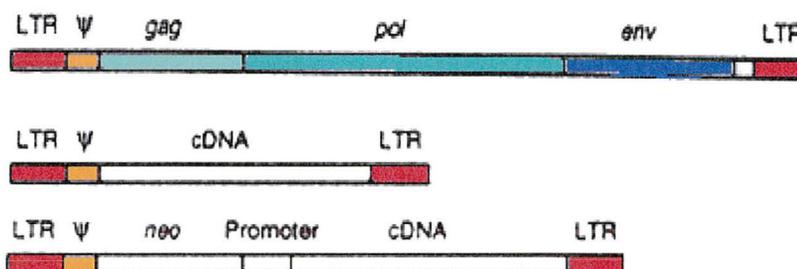
Le génome viral, d'approximativement 10 kb, contient au moins 3 gènes : *gag* (codant pour les protéines du cœur), *pol* (codant pour la reverse transcriptase) et *env* (codant pour les protéines de l'enveloppe). A chaque extrémité du génome se trouvent des séquences terminales (LTR ou Long Terminal Repeat) incluant promoteurs et amplificateurs (promotor/enhancer regions) et des séquences impliquées dans l'intégration. Sont présentes aussi des séquences permettant l'enveloppement de l'ADN viral (*psi*) et des sites d'épissages de l'ARN (gène *env*).

Les rétrovirus utilisés en thérapie génique dérivent le plus souvent du Moloney murine leukaemia virus (Mo-MLV), virus capable d'infecter à la fois les cellules de rongeurs et les cellules humaines.

Les régions essentielles à la réplication du virus et à l'expression du transgène sont les LTR 3' et 5' et la séquence *psi*. Toutes les autres séquences virales, non nécessaires, peuvent donc être enlevées et remplacées par le DNA de la protéine thérapeutique à synthétiser. A ce DNA peuvent être ajoutés :

- des promoteurs et amplificateurs d'origine virale (ex : promoteur du CMV) ou cellulaire,
- un marqueur permettant l'identification des cellules infectées par le virus (ex : résistance à la néomycine),
- un gène augmentant le tropisme du virus à d'autres types cellulaires (ex : Vesicular Stomatitis Virus G protein pseudotyping ou VSV-G protein) et stabilisant le virus lors des méthodes d'ultracentrifugation...

Figure 15. d'après web6 : incorporation d'un transgène dans un rétrovirus : mutation de l'ADN viral : le transgène (en blanc) prend la place des gènes viraux *gag*, *pol* et *env* (en bleu et vert) ; voir texte ci-dessus.



☆ **Avantages :**

- Capables d'infecter divers types cellulaires.
- Pouvoir infectieux exceptionnel, qui leur permet d'atteindre des cellules peu accessibles, telles les cellules souches du sang. Celles-ci présentent un intérêt primordial car elles persistent toute la vie de l'individu. L'intégration de gènes thérapeutiques dans leur ADN pourrait ainsi faciliter la mise au point d'un traitement unique et définitif des malades.
- Transfert du gène efficace.
- Intégration efficace au chromosome habituellement au niveau d'un site unique.

☆ **Inconvénients :**

- L'intégration de leur génome ne peut se faire que dans une cellule en division, d'où leur utilisation restreinte aux tissus qui prolifèrent de façon spontanée ou induite (ne pourront être utilisés pour transfecter l'épithélium pulmonaire, le muscle, le foie ou le tissu nerveux).
- N'acceptent pas de large insertion dans leur génome.
- L'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire correspond à une mutation. Rien n'empêche qu'elle n'altère, au hasard des sites d'intégration, la régulation d'un gène normal dans les cellules d'un patient. S'il s'agit d'un gène impliqué dans le contrôle de la division cellulaire, il pourra en résulter l'apparition d'un cancer. D'où la restriction de la thérapie génique aux seules maladies graves.
- Généralement produit à des titres relativement bas
- Généralement inactivés par la protéine C1 du complément et par les anticorps anti-alpha galactosyl, (d'où difficultés d'utilisation *in vivo*)
- L'expression du transgène est aussi réduite via une inactivation des LTR par les interférons α et γ .

⇒ **En pratique on les utilise surtout dans les méthodes *ex vivo* et pour des tissus en division rapide (fibroblastes) pour lesquels on espère avoir ainsi une expression à long terme du transgène.**

Les **lentivirus** (64, 65, 78) sont un groupe de virus de cette même famille. Cependant contrairement à ce qui vient d'être décrit ils sont aussi capables d'infecter les cellules en division lente.

Le plus connu d'entre eux est le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), virus capable d'infecter les cellules CD4⁺ de l'organisme. Hybridé avec un autre virus il a pu être inactivé et développé comme vecteur pour une délivrance de gène *in vivo*. Le virus hybride ainsi synthétisé possède la capsid et les enzymes du VIH et l'enveloppe d'un autre virus, tel que le Vesicular Stomatitis Virus ou le Moloney Leukemia Virus. Ceci :

- élargit son champ de cellules cibles : les lentivirus ainsi hybridés peuvent infecter a priori toutes les cellules en division lente (et non plus seulement les CD4) ; des essais positifs ont déjà eu lieu sur les cellules cérébrales, rétinienne, musculaires et hépatique.
- limite le risque de réapparition d'une souche sauvage.

Comme les autres rétrovirus, le lentivirus possède les gènes *gag*, *pol* et *env*. Il code aussi pour six protéines, deux essentielles (*tat*, *rev*), et quatre accessoires : (*vpr*, *vpu*, *nef* et *vif*).

Sur le même modèle que pour les rétrovirus, le transgène a pu y être intégré, entre les séquences *psi* et LTR. Certaines des protéines accessoires ont de même pu être enlevées sans qu'il n'y ait de répercussions sur l'infectivité du vecteur ou sur son efficacité (*vpr*, *vpu*, *nef*, *vif* et dernièrement *tat*).

En plus de leur capacité à infecter les cellules en division lente, les lentivirus présentent l'avantage de pouvoir intégrer leur génome au chromosome hôte et de ne pas générer de réponse immune... mais demeurent encore les problèmes d'insertion mutagène et de taille du transgène.

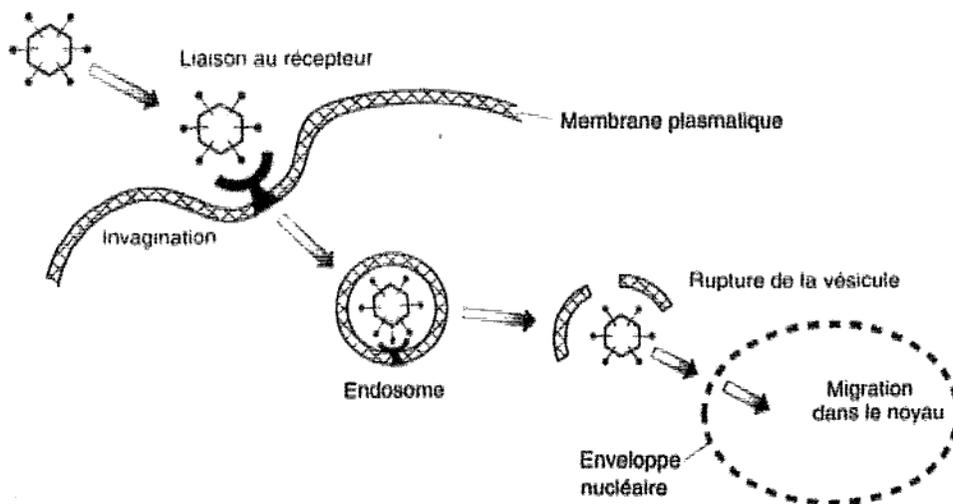
Bien qu'intéressants en théorie, ces virus ne seront pas présentés dans cette étude, puisqu'à ce jour aucune expérience mettant en jeu les gènes de l'hémophilie A ou B n'a été publiée.

2. Famille des Adénovirus :

Les adénovirus (web6, 76) sont des virus enveloppés, à ADN double brin, qui sont responsables d'affections des voies respiratoires supérieures. Ils présentent un tropisme naturel pour l'épithélium respiratoire, la cornée et le système gastro-intestinal. Au contraire des rétrovirus qui ne peuvent infecter que des cellules en division active, ils peuvent infecter un large éventail de types cellulaires. Leur entrée dans la cellule repose sur un mécanisme d'endocytose médiée par un récepteur ; il est efficace, mais l'ADN intégré ne s'insère pas au chromosome et son expression n'est donc maintenue que pendant de courtes périodes.

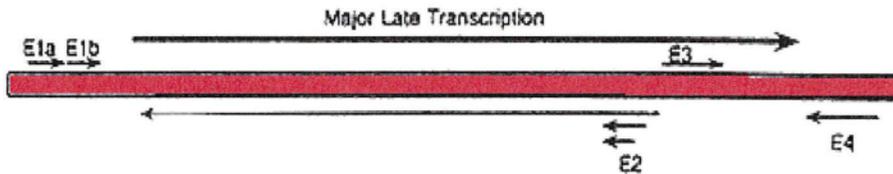
Figure 16. Strachan T, 1998, (76) : pénétration des adénovirus dans les cellules hôtes :

La liaison des protéines d'enveloppe virale sur un récepteur spécifique (récepteur CAR) de la membrane plasmique des cellules est suivie d'une endocytose (processus dans lequel la membrane plasmique s'invagine et se pince pour former une vésicule intracellulaire ou endosome). La rupture ultérieure de la vésicule par les protéines adénovirales permet au virion de s'échapper et de migrer vers le noyau dans lequel l'ADN viral pénètre à travers les pores de l'enveloppe nucléaire



Le génome viral fait approximativement 35 kb (dont 30 kb au maximum peuvent être remplacés par de l'ADN étranger). Il contient 4 régions précoces de transcription (E1, E2, E3 et E4) qui sont des gènes de régulation, et une région tardive qui code pour des protéines de structure et d'assemblage.

Figure 17. web6 : génome de l'adénovirus



Sont présentées les 4 régions de transcription précoce (earlier : E1, E2, E3, E4) et la région tardive :

Rôle de E1 (A et B) : activateur de transcription, inducteur de la croissance cellulaire

E2 (A et B) : réplication de l'ADN, contrôle transcription-polymérase

E3 : modulation de la réponse immunitaire

E4 : fonctions variées : transcription, réplication

La région de transcription tardive : synthèse des protéines de structure et d'assemblage

On distingue 4 générations d'adénovirus recombinants : la 1^{re} génération est déletée des gènes E1 et E3 ; la 2^{ème} génération est elle généralement dépourvue des gènes E1a et E2b, la 3^{ème} des gènes E1 et E4, et la 4^{ème} (on parle aussi de vecteur "gutless") des gènes E1, E3 et E4. Ces délétions ont des répercussions sur la durée de l'expression du transgène, la réponse immune, la synthèse de protéines par le virus...

L'adénovirus recombinant (c'est à dire dont certaines parties du génome ont été déletées) est non répliatif (c'est à dire incapable de se multiplier dans les cellules). Il peut seulement reconnaître le récepteur CAR et entrer dans la cellule par endocytose.

Pour obtenir des préparations d'adénovirus recombinant, il faut donc utiliser des cellules d'encapsidation. Ces cellules qui ont été transformées *in vitro* contiennent les séquences génomiques déletées dans l'adénovirus ;

si on les infecte avec un adénovirus recombinant, elles sont alors capables d'assurer sa répliation et de produire des nouveaux virus.

☆ **Avantages :**

- Capable d'infecter la plupart des types cellulaires humains
- Accepte de larges insertions dans son génome
- Infection efficace des cellules quiescentes ou en division lente (cf. muscle et poumon)
- Pas d'intégration au chromosome
- Production à des titres généralement élevés

☆ **Inconvénients :**

- Pas d'intégration au chromosome
- Expression de la protéine trop brève ?
- Peuvent induire des réponses immunitaires significatives :
réponse CD8⁺ (Ly T cytotoxiques) et CD4⁺ (sécrétion par les Lymphocytes CD4⁺ d'interféron α induisant la synthèse d'anticorps contre l'adénovirus), ceci d'autant plus qu'une grande partie de la population a déjà été exposée à des infections adénovirales (rhume...). Ces réponses immunes vont détruire les cellules infectées, empêcher une future administration du vecteur et inactiver son promoteur.

⇒ **En pratique on l'utilise surtout dans les méthodes de thérapie génique *in vivo* et pour toucher des cellules en division lente**, ceci pour deux raisons :

- ces cellules en division lente ne sont pas accessibles aux rétrovirus,
- si on utilise les adénovirus pour transfecter des cellules en division rapide, le gène, non intégré, ne sera pas transmis aux cellules filles et l'expression du transgène aura lieu pendant un temps insuffisamment long.

⇒ le problème des réponses immunes importantes est, au cours des années, progressivement effacé grâce à l'emploi de vecteurs de plus en plus délétés exprimant de moins en moins de composants viraux.

3. Famille des Virus Adéno-Associés ou AAV :

Les virus AAV (web2, web6) sont un groupe de petits virus non enveloppés, à ADN simple brin. Ils ne peuvent normalement produire d'infection que s'il y a co-infection par un virus-helper, comme un adénovirus (apport des gènes E1A, E1B, E2A, E4, VA RNA). Ce virus helper (adénovirus, virus de l'herpes ou de la vaccine) leur est nécessaire pour accomplir leurs cycles réplicatifs. En l'absence de co-infection, l'AAV humain non modifié s'intègre dans l'ADN chromosomique, habituellement au niveau d'un site spécifique en 19q133-ster.

Le génome des AAV contient uniquement deux gènes : *rep* (codant pour des protéines contrôlant la réplication virale, l'expression des gènes de structure et l'intégration au génome de l'hôte) et *cap* (codant pour les protéines de structure de la capside).

A chaque extrémité du génome se trouvent des séquences terminales (TR ou Terminal Repeat) incluant un promoteur.

Figure 18. web6 : génome de l'AAV



Seules les séquences TR sont essentielles, *cap* et *rep* peuvent être remplacées par un transgène avec ses séquences de régulation associées ; cependant, en l'absence de *rep*, l'intégration de l'AAV se fait au hasard dans le génome hôte. Le virus helper est alors chargé d'apporter les protéines codées par *rep* et *cap* ainsi que les fonctions adénovirales auxiliaires.

Figure 19. web6 : génome de l'AAV transgénique



(La surinfection virale ultérieure peut activer l'ADN viral intégré, entraînant la production de virions.)

Inconvénients :

- Taille maximale des inserts : 4.8 kb
- Réponse immune CD4+, limitant l'efficacité d'une ré-administration ultérieure

Avantages :

- Innocuité
- Peut infecter un large spectre de cellules hôtes
- Peut infecter des cellules quiescentes ou en division lente
- Manipulation aisée car ces virus sont résistants à des conditions extrêmes (pH, détergents, température)
- Intégration au chromosome = expression génique à long terme
- Haut niveau de sécurité : ils s'intègrent dans l'ADN chromosomique, mais 96% du génome AAV parental ayant été délétés, les vecteurs AAV ne possèdent aucun gène viral et les vecteurs recombinants AAV ne contiennent que les gènes d'intérêt.
- Pas de réponse CD8+

⇒ **Les AAV sont donc utilisés aussi bien, en vue de thérapie génique *ex vivo* qu' *in vivo*, indépendamment de la vitesse de division des cellules cibles.**

4. Principaux avantages et inconvénients de quelques vecteurs viraux

Tableau 7. principaux avantages et inconvénients de quelques vecteurs viraux. Pour chacun d'entre eux le facteur limitant majeur est indiqué en gras.

	Avantages principaux	Inconvénients majeurs
Rétrovirus	Pouvoir infectieux +++ Intégration efficace au chromosome	N'infecte que les cellules en division rapide (donc hépatocytes et myocytes non envisageables) Risque d'insertion mutagène Produit à des titres relativement bas N'accepte pas de larges insertions dans son génome (max = 8kb)
	Emploi <i>ex vivo</i> pour la transfection de cellules en division rapide (fibroblastes par exemple)	
Adénovirus	Infecte les cellules en division lente ou rapide Accepte de larges insertions dans son génome (max = 30kb) Production à hauts titres Tropisme hépatique	Pas d'intégration au chromosome Induction de réponses immunes importantes
	Emploi <i>in vivo</i> pour la transfection de cellules en division lente (hépatocytes par exemple)	
AAV	Innocuité Infecte les cellules en division lente ou rapide Intégration au chromosome dans certaines cellules Pas de réponse CD8+	N'accepte pas de larges insertions dans son génome (max = 4.1kb) Réponse immunitaire CD4+
	Emploi <i>in vivo</i> pour la transfection de cellules en division lente (ou rapide), avec expression à long terme	

Le problème des inhibiteurs

Le fait de savoir si l'application de la thérapie génique à l'hémophilie générera, de la part des sujets traités, une réponse immune plus forte que celle obtenue avec les produits recombinants reste une des questions entravant au quotidien le développement des recherches. Le développement de réponses immunes contre les produits du transgène est en effet l'un des problèmes importants fréquemment rencontrés lors des essais de thérapie génique. Il nous faut donc savoir si les protéines recombinantes exprimées par cette méthode sont plus immunogènes que les préparations de facteurs recombinants actuellement utilisées, si les vecteurs utilisés jouent un rôle et lequel dans le développement de cette réponse immune, et dans quelle mesure l'espèce des animaux utilisés dans les expériences majeure ou mineure cette réponse.

Pour étudier ce problème, certains cas sont particulièrement intéressants, il s'agit d'études où les animaux ont **synthétisé des anticorps malgré une thérapie génique autologue** ; ce sont donc des expériences sur le chien puisque les facteurs murins bien qu'étant depuis peu possibles à synthétiser ne sont pas accompagnés de moyens d'études et d'analyses adéquats. Quatre de ces expériences sont retenues ici :

- Dans une des études (44), des chiens hémophiles (l'un transfecté par un lentivirus, l'autre par un AAV, avec dans les deux cas une cible hépatique) ont développé des inhibiteurs contre le facteur IX canin endogène synthétisé. Ces chiens n'avaient jamais développé d'anticorps lors de transfusions antérieures par le facteur IX canin. Ils avaient cependant une mutation génétique les prédisposant à la formation d'inhibiteur.

- Dans une autre étude (44), sur quatre chiens recevant un AAV codant pour le facteur VIII BDD (cible hépatique), un des chiens traité par une forte dose de vecteur a développé des anticorps à hauts titres (1000 unités Bethesda) ; les autres chiens ont eu une apparition transitoire (une à deux semaines) d'inhibiteurs, à des titres allant de 2 à 40 unités Bethesda selon les quantités de vecteur injectées. Il faut noter que ces chiens ont tous eu une réaction inflammatoire du foie associée à l'injection virale.
- HERZOG et ses collaborateurs, sur 7 chiens traités par un AAV codant pour le facteur IX (cible musculaire), n'ont eux retrouvé qu'un seul cas d'inhibiteur, d'expression transitoire et notent que le chien concerné a développé une infection cutanée concomitante aux environs de l'injection qui aurait pu stimuler la synthèse d'anticorps (37).
- SNYDER et son équipe n'ont eux retrouvé aucun cas d'inhibiteurs sur deux chiens traités par un AAV exprimant le facteur IX canin (voie intraportale) (73).

Il apparaît donc de ces expériences que plusieurs facteurs peuvent influencer à différents degrés la réponse immune :

☆ Tout d'abord, **le type de mutation** :

Concernant l'hémophilie B : les chiens utilisés dans les 3 dernières expériences appartenaient en effet à la Chapel Hill colony et portaient donc une mutation faux-sens (ils expriment des taux normaux d'ARNm mais aucune protéine n'est retrouvée dans la circulation sanguine bien qu'elle soit synthétisée ; cette présence de protéine suffit à rendre les chiens tolérants au facteur IX). Les chiens (Auburn) utilisés dans la première expérience avaient au contraire une mutation génétique de type délétion, donc de très faibles taux d'ARN transcrit et aucune protéine synthétisée (sauf après accumulation de l'ARNm à des taux suffisants pour déclencher une synthèse) ne favorisant pas le développement d'une tolérance. Ils étaient donc plus susceptibles de fabriquer des inhibiteurs.

En ce qui concerne l'hémophilie A, on ne sait malheureusement pas encore quelles mutations génétiques affectent les chiens touchés par cette maladie.

☆ On peut ensuite supposer que la **nature du tissu ciblé** influe sur la réponse immune :

les productions significatives d'anticorps concernent en effet les expériences visant les hépatocytes. La majorité des chiens traités par voie intramusculaire n'ont pas eu de réponse immune significative. On pourrait au premier abord penser que le muscle est un site protégé des réponses immunes.... Ceci apparaît improbable étant donné que ce tissu est fréquemment utilisé pour induire une immunité face à diverses protéines (vaccinations par voie IM)

☆ Une autre explication plus probable résulte en fait dans **la capacité des différents virus à déclencher une réaction inflammatoire** : l'expression de particules virales, la mort cellulaire ou la présence de facteurs pro-inflammatoires dans les concentrés de vecteurs injectés induiraient une réponse locale de l'hôte au site d'infection (via une production de lymphokine), et une augmentation de la production des molécules du CMH de classe I et II responsables de la présentation de l'antigène. C'est le déclenchement de cette réponse immune qui, agissant comme co-signal, **favoriserait la reconnaissance par le système immun du facteur thérapeutique comme une protéine étrangère**. Si cette hypothèse s'avère vraie, alors l'emploi de préparations moins immunogènes (AAV par exemple qui contrairement aux adénovirus ne transfectent pas les CPA et donc amènent une présentation moins efficace de l'antigène) devrait permettre d'éviter la formation d'inhibiteurs.

☆ Enfin une dernière hypothèse intéressante suggère que **le mécanisme de présentation de l'antigène aux cellules de l'immunité** soit différent entre le facteur de coagulation injecté par voie IV et celui identique mais synthétisé dans l'organisme. Les protéines injectées par voie IV, qui sont donc exogènes, donnent en effet lieu à des mécanismes faisant intervenir le CMH de classe II (qui s'occupe des peptides dérivant de protéines issues de

l'environnement). Les facteurs transfectés synthétisés dans l'organisme, et donc endogènes à celui-ci, induiraient en revanche plutôt des mécanismes faisant intervenir les molécules de classe I du CMH (présentation des peptides dérivés de protéines synthétisées par nos cellules). Cette hypothèse, basée sur une meilleure connaissance du fonctionnement du CMH, pose d'un point de vue pratique une question : la thérapie génique pourrait-elle induire la formation d'anticorps inhibiteurs chez des patients jusqu'à présents considérés comme tolérants aux facteurs exogènes, ou entraînerait-elle au contraire une immunité plus faible à celle faisant suite à une injection de facteur recombinant ?

En vue d'une thérapie génique humaine, quelle sorte de réponse immune sommes nous en droit d'attendre ? Plus forte que celle engendrée par les traitements classiques ?, Plus faible ?

Une chose est sûre, elle sera vraisemblablement variable en fonction du choix des méthodes employées, influencée par le type de vecteur choisi, la réponse inflammatoire associée à l'injection, et à l'infection virale, le tissu ciblé, les antécédents du patient traité, l'emploi en parallèle d'agents immunosuppresseurs

Si l'emploi même d'agents vectoriels étrangers à l'organisme est un facteur laissant présager une aggravation des réponses immunes, certains chercheurs espèrent pourtant que :

- l'expression protéique permanente obtenue par thérapie génique pourrait être l'équivalent d'une perfusion continue et assurer ainsi la tolérance de l'antigène,
- l'expression endogène protéique serait mieux tolérée et moins immunogène que la même molécule apportée par voie exogène.

Reste enfin à savoir si l'apparition d'inhibiteurs lors d'expérimentations de thérapie génique serait (comme dans le cas de ceux faisant suite à l'injection de facteurs recombinants exogènes) négativée par l'injection de hautes doses de facteurs, ou si leur apparition pourrait être prévenue par l'emploi d'agents immunosuppresseurs.

PARTIE 3

expérimentations sur l'animal

-Chapitre 1-

***expériences utilisant
des vecteurs viraux
pour traiter
l'hémophilie B***

La taille relativement petite de la séquence codante du facteur IX et le fait qu'un grand nombre de cellules autres que les hépatocytes soit capable de le produire sous forme biologiquement active a contribué au développement de l'hémophilie B comme modèle pour le traitement des maladies génétiques par thérapie génique. Au cours du développement de ces recherches, plusieurs systèmes de vecteurs sont apparus, plusieurs tissus ont été ciblés, moyennant une seule condition : que le facteur IX sécrété rejoigne la circulation sanguine.

Au début de cette partie se trouve un tableau, récapitulatif d'un certain nombre d'expériences menées *ex vivo* et *in vivo* sur l'animal (les études *in vitro*, trop nombreuses, car préalables à tout essai sur l'animal, n'y figurent pas). Ce tableau n'est certes pas exhaustif ; il permet cependant, grâce à la présentation d'une vingtaine d'expérimentations, de se faire une idée relativement précise des résultats obtenus et de leur évolution au cours des années. Les études y sont classées par sous-groupe en fonction du type de vecteur utilisé (rétrovirus, adénovirus, AAV) à l'intérieur desquels l'ordre chronologique est respecté. Pour chacune d'entre elles, sont indiqués :

- le vecteur utilisé et ses composants (promoteur et amplificateur employés pour accroître l'expression, origine humaine ou canine du transgène inséré...),
- le type d'animaux employés, et leur nombre,
- la méthode choisie pour transfecter les cellules, la voie d'administration et le nombre de cellules (méthodes *ex vivo*) ou virus (méthodes *in vivo*) injecté par animal,
- la durée de l'expression obtenue,
- les taux de facteur IX ainsi obtenus chez l'animal.

Le texte qui suit ce tableau insiste lui, sur l'évolution des idées au cours des années, les problèmes rencontrés au cours des expériences, les solutions proposées, les grands succès et limites de chaque méthode, les éléments qui ont orienté la recherche vers de nouvelles

stratégies, toujours plus complexes. Toutes les expériences présentées dans le tableau n'y sont donc pas forcément reprises, seules sont présentées en détail celles jouant un rôle clé dans l'histoire de la thérapie génique associée au facteur IX, et même pour celles-ci, seuls les points essentiels sont généralement soulignés ; d'autres éléments du tableau, pourtant importants n'y sont donc pas repris.

Tableau 8 : Expression du facteur IX in vivo

référence	vecteur	animal	méthode	Durée de l'expression	Taux maximal de fIX
(67) 1989	Rétrovirus Promoteur CMV MLV LTR h fIX	Souris immunodéficientes N=1	Introduction pas voie SC de fibroblastes humains génétiquement modifiés et entourés d'une matrice de collagène	Moins de 7 jours	190 ng/ml
(86) 1992	Rétrovirus Promoteur LTR h fIX	Souris C3H N= 1 N= 1	Injection IM en 20 à 50 sites de myoblastes génétiquement modifiés (+ ciclosporine) : 1 injection : 2.10^7 myoblastes/souris 1 injection : 3.10^7 myoblastes/souris	Plus de 4 semaines Moins de 4 semaines	350 ng/ml 1000 ng/ml
(15) 1992	Retrovirus Promoteur CMV humain Mouse MCK enhancer c fIX	Souris immunodéficientes N= 1 N= 3 N= 2 N= 1 N= 1	Injection IM en 20 à 40 sites de myoblastes génétiquement modifiés : 1 injection : 1.10^7 myoblastes/souris 1 injection : 8.10^6 myoblastes/souris 2 injections : 1.10^7 (J0)+ 1.10^7 (J5) 2 injections : 6.10^6 (J0)+ 6.10^6 (J5) 1 injection : 6.10^6 myoblastes/souris	Plus de 5 semaines Plus de 12 semaines Plus de 17 semaines Plus de 24 semaines Plus de 24 semaines	Obtention d'un plateau long et stable 7 ng/ml 7 ng/ml 20 ng/ml 12 ng/ml 7 ng/ml
(48) 1993	Retrovirus Promoteur CMV c f IX	Chiens hémophiles N= 4 Dont 1 qui meurt	Hépatectomie partielle (mort de 1 chien) , puis injection par la veine porte de 5.10^8 vecteurs/chien (dose cumulée) sur 3 jours consécutifs	Plus de 20 semaines	Correction phénotypique partielle Chien A : 2 à 6 ng/ml Chien B : 2 à 6 ng/ml Chien C : 3 à 10 ng/ml
(40) 1996	Rétrovirus Viral LTR promoteur h fIX	Souris C57/B16 N= 2 N= 4	Introduction dans la cavité péritonéale de myoblastes génétiquement modifiés et encapsulés : 8.10^5 myoblastes/souris 5.10^6 myoblastes/souris	Moins de 7 jours Moins de 14 jours	1.5 ng/ml 3.8 ng/ml
(83) 1998	Retrovirus MFG Promoteur Viral LTR h fIX	Souris immunodéficientes N = 17	Greffe cutanée de keratinocytes génétiquement modifiés et encapsulés $1.4.10^6$ keratinocytes/souris	Plus de 1 an	Pic entre 0.5 et 2.75 ng/ml selon les souris Puis décroissance rapide Taux relativement maintenus aux environs de 0.2 ng/ml

(46)	1994	Adenovirus RSV LTR promoteur c f IX	Chiens hémophiles N=2	Injection par la veine porte de $2,4 \cdot 10^{10}$ vecteurs/chiens	10 semaines	50 000ng/ml (J2) puis décroissance rapide correction phénotypique transitoire
			Souris C57/B16 N=4	$1 \cdot 10^{10}$ vecteurs/souris	plus de 31 semaines	1000 ng/ml (J15) puis plateau
(79)	1996	Adénovirus délété E1, E3 CMV promoteur h fIX	Souris CD1	2 injections IV, la 2ème injection étant réalisée quand les taux de fIX passent en dessous des $0,06 \mu\text{g/ml}$ (soit 0.1%)	14 semaines	Pic : $140 \mu\text{g/ml}$ Puis décroissance Pas de synthèse de fIX à la 2 ^{ème} injection
			Adulte : N=2	$1 \cdot 10^{11}$ (J0) + $1 \cdot 10^{11}$ (semaines 14) vecteurs/souris		
(62)	1997	Adenovirus délété en E1	Souris C57/B16	Injection IV unique h fIX	Etude sur 13 semaines	1000 ng/ml puis plateau
			Autres souches de souris immunocompétentes	h fIX	6 semaines	50 à 900ng/ml puis rapide décroissance
			Souris C57/B16	c fIX	Etude sur 4 semaines	>10 000 ng/ml puis plateau
			Souris SCID	h fIX et CMV promoteur h fIX et RSV promoteur	Etude sur 8 semaines	> 10 000 ng/ml puis plateau > 100 ng/ml
(54)	1998	Adenovirus délété E1 CMV promoteur h fIX	Souris hémophiles & C57/B16 N= 6	Injection via la veine caudale de $1 \cdot 10^{11}$ vecteurs/souris	Plus de 12 semaines	Pic entre 30 et $85 \mu\text{g/ml}$ (J7) selon souris puis décroissance
			Souris hémophiles CD1 N= 6		Plus de 7 semaines	Pic entre 3 et $15 \mu\text{g/ml}$ (J7) selon souris puis décroissance très rapide : $0 \mu\text{g/ml}$ à J14

(51)	1997	Adeno Associated Virus RSV LTR ou MLV LTR promoteur h fIX	Souris C57/B16 N= 6	Injection unique par la veine caudale De 3.10^5 à 2.10^9 vecteurs/souris Puis irradiation du foie par rayons gamma	Plus de 20 semaines	0.9 ng/ml
(74)	1997	Adeno Associated Virus MFG promoteur h fIX	Souris C57/B16 N= 11	Injection unique par la veine porte de 2.10^{10} à $8,4.10^{10}$ vecteurs/souris	Plus de 36 semaines	Selon les souris : plateau entre 250 et 2000ng/ml
(35)	1997	Adeno Associated Virus CMV promoteur/enhancer Intron I h f IX	Souris C57/B16 N= ? Souris Rag 1 immunodéficientes N= ?	Injection intramusculaires en 4 sites de 1.10^{10} ou 2.10^{11} vecteurs/souris	0 plus de 21 semaines	Pas de fIX détecté dans le sang Mais fIX présent dans le muscle et sous forme liée au collagène Augmentation lente pendant 5 à 7 semaines Puis phase de plateau longue 1.10^{10} plateau à 100 ng/ml 2.10^{11}plateau à 290 ng/ml
(63)	1998	Adeno Associated Virus h f IX CMV promoteur/enhancer EF1 α promoteur/enhancer	Souris CD1 âgées de 1 jours N= 14 Souris CD1 adultes N= ? Souris C57/B16 N= 2 Souris C57/B16 N= 2 N= 4 N= 4	Injection par une veine temporale superficielle de 1 à 2.10^{11} vecteurs/souris Injection par la veine porte de 1.10^{11} vecteurs/souris Injection par la veine porte de 1.10^{11} vecteurs/souris Injection par la veine porte de $6,3.10^{10}$ vecteurs/souris $5,5.10^{10}$ vecteurs/souris $2,7.10^{11}$ vecteurs/souris	Moins de 5 semaines 0 0 Etude sur 30 semaines Etude sur 6 semaines Etude sur 6 semaines	55 à 110 ng/ml (J5) puis décroissance rapide 0 car promoteur CMV 0 car promoteur CMV pendant toute la durée de l'expérience et selon les souris: plateau : 250 à 320 ng/ml plateau : 150 à 200 ng/ml plateau : 700 à 3200ng/ml

(73)	1999	Adeno Associated Virus MFG promoteur h f IX c f IX	Souris hémophiles & C57/B16 N=3 N=3 Chiens hémophiles N=2	Injection par la veine porte de : 4,2.10 ¹⁰ vecteurs/souris 6,3.10 ¹⁰ vecteurs/souris 2.10 ¹² vecteurs/chien	Etude sur 60 semaines 18 semaines 35 semaines	pendant toute la durée de l'expérience Selon les souris: pic entre 250 et 450 ng/ml pic entre 400 et 1800 ng/ml chien 1 : 30 à 95 ng/ml chien 2 : 10 à 45 ng/ml
(81)	1999	Adeno Associated Virus LSP liver promoteur/enhancer c f IX	Souris hémophiles & C57/B16 N= 4 N= 45 Souris hémophiles & 129 N= 3	Injection par la veine porte de 2.10 ¹¹ vecteurs/souris 5,6.10 ¹¹ vecteurs/souris 2.10 ¹¹ vecteurs/souris	Etude sur 16 semaines Etude sur 22 semaines Etude sur 16 semaines	Après 2 à 4 semaines, plateau se maintenant pdt toute l'expérience Plateau à 5000 ng/ml Plateau >15000 ng/ml Plateau à 1000ng/ml
(37)	1999	Adeno Associated Virus CMV promoteur c f IX	Chiens hémophiles N= 5	Injection IM unique en plusieurs sites de : Chien A : 1,3.10 ¹¹ vecteurs/chien Chien B : 1,1.10 ¹² vecteurs/chien Chien C : 3,4.10 ¹² vecteurs/chien Chien D : 3.10 ¹² vecteurs/chien Chien E : 8,5.10 ¹² vecteurs/chien	Etude portant sur : Plus de 70 semaines Plus de 55 semaines Plus de 45 semaines Plus de 10 semaines Plus de 35 semaines	Moyenne : 2.5 ng/ml Moyenne : 12 ng/ml Moyenne : 17 ng/ml Moyenne : 21 ng/ml Moyenne : 69 ng/ml
(80)	2000	Adeno Associated Virus LSP liver promoteur/enhancer c f IX	Chiens hémophiles N= 2 N= 1 N= 1	Injection par la veine porte de : 5.10 ¹² vecteurs/chien 1,4. 10 ¹³ vecteurs/chien 8,7.10 ¹³ vecteurs/chien	Etudes portant sur : 54 semaines 14 semaines 27 semaines	Plateau à : 3,5 ng/ml 25 ng/ml 220 ng/ml
(34)	2000	Adeno Associated Virus CMC et HSA promoteur/enhancer h f IX	Souris Rag 1 Immunodéficientes N = 4	Injection par voie intramusculaire en 4 sites de 1.10 ¹¹ vecteurs/souris	Etude portant sur : 12 semaines	Plateau à : 330ng/ml

(66)	2001	Adeno Associated Virus promoteur β actin enhancer CMV h f IX	Souris C57/Bl6 ou SCID (résultats identiques pour les 2 lignées) N = 10	Injection de 5.10^{10} vecteurs/souris par voie : IV IP IM	Etudes portant sur 30 semaines	Plateau à : 300 ng/ml 250 ng/ml 80 ng/ml
------	------	--	--	--	-----------------------------------	---

Les premiers essais réalisés ont envisagé la moelle osseuse et les cellules cutanées comme candidats les plus appropriés à la recherche, ceci dans la mesure où, les procédures cliniques de transplantation étaient déjà existantes et que ces tissus étaient déjà connus comme (à l'inverse du tissu hépatique par exemple) pouvant être génétiquement modifiés par les premiers vecteurs mis au point, les rétrovirus.

Expériences EX VIVO

1 / emploi de fibroblastes

La réalité du transfert du gène du facteur IX aux cellules hôtes, l'expression de la protéine correspondante, et sa fonctionnalité ont été prouvés dès 1987 par Anson et son équipe (20), au cours d'une expérience *in vitro* utilisant des fibroblastes cultivés au contact d'un **rétrovirus** génétiquement modifié (porteur du gène du facteur IX).

Ces résultats, démontrant que la synthèse du facteur IX et les modifications post-traductionnelles, normalement effectuées par le foie, ont aussi cours dans les cellules cutanées, ont alors ouvert la voie à d'autres expérimentations utilisant la **peau comme tissu cible** (et employant toujours les vecteurs dérivés des rétrovirus).

La réalité du transfert et la fonctionnalité du facteur IX ainsi synthétisé étant prouvées *in vitro*, il restait à vérifier ceci *in vivo* et à chiffrer la durée de l'expression et les quantités de facteur obtenues par cette méthode. En 1988 (75), des **fibroblastes murins** génétiquement modifiés, et codant pour le **facteur IX humain**, ont dans ce but été enrobés d'une matrice de collagène (sensée diminuer les réactions de l'hôte contre ces cellules étrangères) et greffés sur des **souris immunocompétentes et non hémophiles**. La production de facteur IX alors

mesurée (détectée par des anticorps spécifiques) a cependant disparu après seulement 10-12 jours, prouvant toutefois deux éléments majeurs :

- la capacité des fibroblastes à distribuer le facteur IX à partir d'un site sous-cutané,
- la synthèse, par l'animal, d'anticorps dirigés contre le facteur IX humain : la disparition rapide du facteur IX ne sera en effet pas attribuée au rejet de la greffe mais à l'apparition d'anticorps spécifiques contre la protéine humaine. Ce résultat se retrouvera d'ailleurs dans de nombreuses expériences comme facteur limitant de l'efficacité des thérapies (55).

L'année suivante (67), l'injection SC de **fibroblastes humains** (transfectés par un rétrovirus et enrobés de collagène) est cette fois réalisée sur des **souris immunodéficientes**, avec des taux de facteur IX humain mesurés de l'ordre de 190 ng/ml (soit environ 3% des taux humains normaux). Contre toute attente, (puisque l'immunodéficiência des souris est sensée permettre une expression prolongée du transgène) cette production s'annule au bout de seulement 7 jours.

Ce résultat, qui ne peut bien sûr être expliqué, ni par un rejet de greffe, ni par la synthèse d'anticorps contre une protéine humaine, sera en fait attribué à la **non persistance des fibroblastes humains chez la souris** (persistance qui nécessiterait comme support un complément de cellules dermiques et épidermiques humaines). Cette hypothèse sera confirmée par la greffe, cette fois-ci chez le rat immunodéficient, de **fibroblastes de rat**, qui se traduira par une expression du transgène (facteur IX) pendant plus de quarante jours (66).

Une autre hypothèse retenue pour expliquer la faible durée d'expression du transgène est l'inactivation *in vivo* du **promoteur viral** employé (20, 55, 67). Cette idée sera confirmée en 1991 dans une expérience *in vivo* de greffe fibroblastique (72) : les chercheurs montrent que si l'utilisation d'un promoteur viral induit effectivement une expression à court terme du transgène (dans leur cas le gène codant pour la β galactosidase), l'usage d'un promoteur

cellulaire, non inactivé *in vivo* (ici promoteur de la DiHydroFolate Reductase) permet en revanche une expression prolongée.

Enfin, suite à ces résultats sur les rongeurs, un essai *in vitro* a été tenté sur des **fibroblastes canins** (2, 1990) afin d'enregistrer les premières données susceptibles de déboucher sur un essai sur le chien. Le facteur IX alors synthétisé a été analysé comme biologiquement actif (mesures d'hémostase *in vitro* prouvant une correction phénotypique). Cette série d'études qui aurait dû se poursuivre par des essais *in vivo* sur le modèle canin, n'a malheureusement jamais été complétée...

Malgré ce manque d'information sur le modèle canin, un **essai sur l'homme** a eu lieu en Chine (29, 41), où deux frères âgés de 9 et 13 ans et atteints d'hémophilie B sévère ont été traités ainsi par une méthode *ex vivo*, avec un succès limité (1993) : les fibroblastes autologues prélevés (génétiquement modifiés par un rétrovirus pour exprimer le facteur IX humain, caractérisés *in vitro* et enrobés d'une matrice de collagène) leur ont été réimplantés. Des taux de facteurs IX élevés par rapport aux taux initiaux des patients *auraient été maintenus* suite à cette opération pendant plus de 420 jours, avec dans le même temps une augmentation de l'activité coagulante et une correction partielle des tendances hémorragiques (cet article chinois n'a, à ma connaissance, pas été validé par d'autres comités scientifiques).

Bien que ces résultats aient été quelque peu encourageants, l'emploi des fibroblastes a été délaissé par la suite, du fait d'une synthèse protéique à la fois trop faible et trop brève.

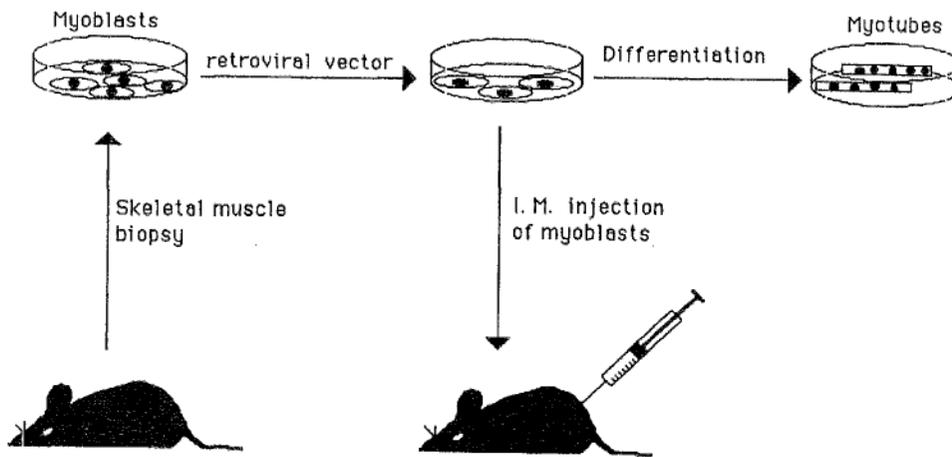
Dans le but de remédier à ces problèmes, l'étude d'autres tissus a donc été abordée (en utilisant toujours les **rétrovirus** comme vecteur) :

2/ emploi d'autres tissus

- **Kératinocytes** (28, 1996) (essai *in vitro*) : l'activité moyenne du facteur IX synthétisé a été évaluée à 87%. Ce taux bien supérieur à ceux évalués dans les premiers essais (1993) a remis les kératinocytes au rang des tissus cibles possibles. Une étude *ex vivo* a ainsi pu être menée en 1998 (84) ; les résultats obtenus sur des souris immunodéficientes sont faibles mais prolongés et confirment l'intérêt potentiel des greffes de kératinocytes.
- **Hépatocytes** (1, 1990) (essai *in vitro*, avec stimulation de la multiplication cellulaire) : bien que la durée de l'expression n'ait pas été mesurée, cette expérience prouve la réalité du transfert (20% des hépatocytes cultivés ont été effectivement transfectés), l'efficacité de la production protéique (les cellules transfectées synthétisent 10 fois plus de facteur qu'un hépatocyte normal) et l'activité du facteur néo-synthétisé (normalisation des tests de coagulation).
- **Cellules endothéliales** (essai *in vitro*) (87, 1991) : ici encore, les auteurs prouvent que ces cellules sont pourvues d'un mécanisme leur permettant de réaliser les modifications post-traductionnelles nécessaires à l'activité du facteur (dont la γ carboxylation). Les propriétés de l'endothélium (grand nombre de cellules, accès facile, contact direct avec la circulation sanguine) suggèrent de plus que ces cellules pourraient être un véhicule adéquat du transfert de gène.
- **Cellules musculaires** (86, 1992) : se basant sur la sûreté de la méthode (déjà testée dans les essais sur la myopathie de Duchenne), l'accès facile du tissu musculaire et sa bonne vascularisation, la faisabilité du transfert de gène par l'utilisation de myoblastes a alors été démontrée en utilisant la méthode ci-dessous :

Des cellules C2C12 (lignée myoblastique dérivant de souris C3H), transfectées par un rétrovirus codant pour du facteur IX humain, et sécrétant *in vitro* $2.6 \mu\text{g}/10^6$ cellules/24h de facteur IX actif à 81-90% (donc un taux élevé de facteur IX, et se stabilisant - *in vitro*- à $0.68 \mu\text{g}/10^6$ cellules/24h après différenciation des myoblastes en myotubes), ont été introduites par voie IM dans le muscle squelettique de souris C3H (non hémophiles, non immunodéficientes) préalablement traitées par injection de ciclosporine (agent immunosuppresseur) :

Figure 20. Kurachi, 1993, (55) : transfert de gène ex vivo par l'usage de myoblastes.



L'injection de 3.10^7 myoblastes/souris a alors conduit à la détection de facteur IX humain pendant 28 jours après l'injection (pic à $1 \mu\text{g}/\text{ml}$), la diminution progressive de ce taux (nul après 4 semaines) étant attribuée à la formation d'anticorps contre la protéine humaine.

Les chercheurs ont tenté d'estimer le pourcentage de facteur IX synthétisé (calcul par rapport aux essais *in vitro*) qui était délivré dans la circulation sanguine et l'ont évalué à 29% (en se basant sur le modèle cinétique à deux compartiments, avec $T_{1/2}$ du facteur IX humain chez la souris = 17,8h).

Les taux produits étaient importants et suffisants pour envisager une application à l'homme. Ainsi, bien que l'expression du facteur dans cette première expérience ait été trop transitoire (résultat retrouvé en 1992 par une étude similaire), ceci a encouragé (20) le développement d'autres rétrovirus pourvus de nouveaux artifices (promoteurs, amplificateurs...) permettant ainsi par exemple une expression prolongée du facteur IX pendant plus de 6 mois, grâce à l'emploi d'un rétrovirus équipé de l'amplificateur MCK murin (Muscle Creatine Kinase) et du promoteur CMV (expression ayant toutefois lieu à des taux plus faibles de l'ordre d'une dizaine de ng/ml, contre un pic à 1 µg/ml dans l'expérience précédente) (15).

Malgré ces résultats satisfaisants sur la souris, la transposition d'échelle souris/chien n'a pas été réussie (la réimplantation de myoblastes n'a hélas pas été un succès sur le modèle canin). Cette transposition qui est typiquement une étape critique validant l'efficacité d'un protocole prometteur, a signé par son échec l'abandon progressif des essais musculaires.

Myoblastes et fibroblastes étant peu à peu délaissés, les chercheurs ont en fin de compte fini par se pencher sur le tissu à première vue le plus utilisable pour une thérapie génique *ex vivo* ou *in vivo* : le **foie**, lieu naturel de production des deux facteurs. Cependant, étant donnée sa faible capacité de transfection par les rétrovirus (due à une division lente de ces cellules), son utilisation nécessitait l'emploi d'une méthode permettant de stimuler son renouvellement cellulaire.

Dans ce but, un essai *in vitro* avec stimulation de la synthèse des hépatocytes a donc été tenté (1, 1990). Cette expérience s'est révélée peu satisfaisante. Prenant de plus en compte l'impossibilité de greffer les hépatocytes en nombre suffisant, l'idée d'un essai *ex vivo* a rapidement été abandonnée, ceci au profit des méthodes *in vivo*.

Expériences *IN VIVO*

1/ emploi de rétrovirus

Suite à la démonstration en 1991 (23) qu'un foie en régénérescence pouvait être efficacement infecté par les rétrovirus, KAY et ses collaborateurs ont expérimenté en 1993 (48) la transfection par un rétrovirus codant pour le facteur IX canin sur un chien hémophile ayant subi une **hépatectomie** partielle. Les taux de facteur détectés, bien que faibles (environ 0.1% des taux normaux), ont été maintenus pendant plus de 5 mois, et chose plus importante, une correction partielle du phénotype a été observée, avec une diminution des aPTT et WBCT.

Ce résultat encourageant emploie cependant une méthode très invasive (hépatectomie) et ne pouvait donner lieu à une application sur l'homme.

Face à cette impasse, les alternatives proposées par les chercheurs sont allées dans quatre directions (17), les trois premières restant dans le domaine des rétrovirus, la quatrième engageant la thérapie génique dans une voie radicalement différente :

- 1/ Administration préalable d'un vecteur adénoviral codant pour l'activateur du plasminogène type urokinase : cet activateur est connu pour induire des dégâts hépatiques suivis d'une régénération et il a été supposé que l'injection répétée de rétrovirus durant cette phase de régénération pouvait donc induire une transfection efficace (pas d'essai réalisé).
- 2/ Utilisation de hautes doses de rétrovirus : les hautes doses pouvant être obtenues à cette époque étant susceptibles d'améliorer l'efficacité du transfert.
- 3/ Emploi de rétrovirus incorporant des éléments des lentivirus (64, 65), et qui sont alors

capables d'infecter des cellules en division lente tout en maintenant une intégration de leur génome au chromosome hôte. Cet usage devrait permettre une transfection efficace des hépatocytes et une production de facteur IX sur le long terme (17), le seul problème restant étant la production à hautes doses des lentivirus.

- 4/ L'emploi d'adénovirus (premières études de manipulation des adénovirus et protocole de transfert de gène en 1991) qui permettent une transfection du foie et d'autres tissus en division lente à des taux élevés : à des doses relativement sans danger, 90% des hépatocytes sont transfectés (17) (gardons toutefois en mémoire qu'administrée *in vivo*, la souche sauvage d'adénovirus peut créer des hépatites cytolitiques doses dépendantes).

Conclusion : les rétrovirus se montrent pour l'instant peu efficaces pour une transfection hépatique *in vivo*.

2/ emploi d'adénovirus

Dès 1993, se sont donc multipliés les essais utilisant comme vecteurs les **adénovirus**.

Après infection d'une cellule, ces virus, relativement bénins pour l'homme, expriment leur gène E1 (E1 code pour des protéines activant la transcription des gènes viraux impliqués dans la réplication de leur ADN et la synthèse des protéines d'enveloppe). C'est cette région E1 qui a pu être remplacée par le gène thérapeutique chez les premiers adénovirus mis au point.

2.1/ premières expériences

En 1993, une équipe a ainsi généré un adénovirus délété E1 codant pour le facteur IX, et l'a injecté dans l'organisme de souris (via la veine caudale) (20). Cette injection systémique a permis, du fait de l'affinité des adénovirus pour le foie, une transfection efficace des

hépatocytes qui s'est traduite initialement par une production de facteur à des taux thérapeutiques pour l'homme. Ces taux ont par la suite progressivement diminués pour devenir nuls après **9 semaines**. La réinjection des mêmes adénovirus a alors été tentée. Elle s'est révélée complètement inefficace et aucune synthèse de facteur IX n'a pu être détectée, probablement suite à la formation d'anticorps lors de la première injection.

2.2/ succès

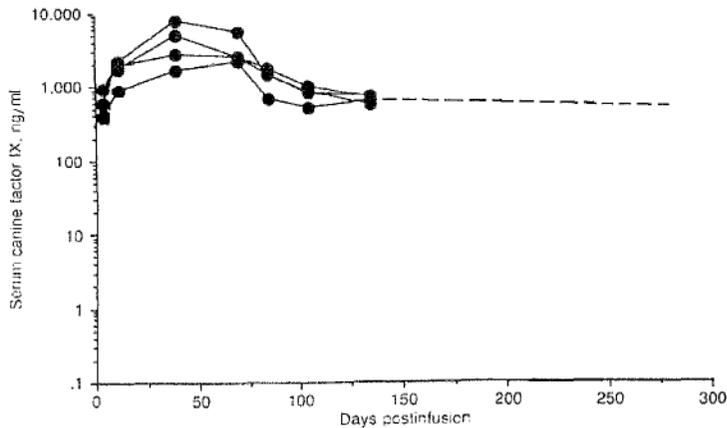
En 1994 (46), une première étape importante dans l'histoire de la thérapie génique appliquée à l'hémophilie a été franchie par l'injection (veine porte) à deux **chiens hémophiles** d'adénovirus codant pour le facteur IX canin. Cette injection s'est traduit par l'apparition en moins de 18 heures de taux normaux de facteur IX, atteignant 250 à 300% des taux plasmatiques normaux après 48 heures, et induisant une **correction phénotypique complète**. Cette correction n'a cependant été que transitoire : les taux sanguins ont en effet rapidement décré pour atteindre 1% des taux normaux après 3 semaines et 0.1% après 8 semaines, le WBCT totalement corrigé dans la première semaine re-augmentant en parallèle progressivement.

La même expérience (même vecteur, même méthode) (46) a aussi été pratiquée sur 4 **souris de souche C57/Bl6**. Ces souris ne sont ni hémophiles, ni immunodéficientes, mais présentent d'après divers résultats une certaine tolérance aux facteurs IX humain et canin lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse.

L'expression du facteur IX s'est, dans cette expérimentation, maintenue pendant **plus de 31 semaines** à des taux proches de 1000 ng/ml (**soit 20% des taux humains normaux**), ces taux étant atteints après une quinzaine de jours et se maintenant sous forme d'un long plateau :



Fig 21. Kay, 1994 (46) : taux de facteur IX plasmatique obtenus après injection d'un adénovirus (veine portale) (4 souris C57/Bl6 traitées). Sont présentés ici une partie des résultats obtenus dans l'expérience (46). Les taux obtenus par injection d'adénovirus sont typiquement élevés dès le 1^{er} jour suivant l'injection.



Ce résultat très enthousiasmant semble pouvoir être attribué à :

- **l'origine canine du facteur IX utilisé** (apparemment moins immunogène chez la souris que la protéine humaine) : l'emploi sur ces souris C57/Bl6 d'adénovirus codant pour les facteurs IX humain ou canin (62) prouve une expression protéique dix fois plus élevée lors de l'utilisation de l'adénovirus codant pour la protéine canine.
- **la souche de souris employée (C57/Bl6) et la voie d'injection choisie (administration IV)** : la comparaison de la tolérance immunitaire au facteur IX d'autres espèces de souris immunocompétentes montre l'intérêt de la lignée C57/Bl6 : suite à une injection IV unique d'adénovirus (62, 54), les taux de facteur IX sanguins sont plus importants et plus stables dans cette lignée, traduisant ainsi leur relative tolérance immunitaire.
- **l'usage du promoteur RSV** : l'emploi des promoteurs se fait dans le but d'accroître à la fois le taux et la durée d'expression des produits du transgène. Le promoteur RSV s'est, dans cette expérience, montré bien plus efficace que le promoteur PGK testé en parallèle. La comparaison des deux promoteurs les plus utilisés (dérivés des virus RSV et CMV) réalisée quelques années plus tard en 1997 (62) prouve cependant de façon nette la

supériorité du promoteur CMV à la fois dans les domaines quantitatif et qualitatif (injection IV unique d'adénovirus délété E1 à des souris immunodéficientes), et laisse espérer d'autres succès.

2.3/ limites

Malgré ce résultat fantastique, le transfert de gène associé aux adénovirus s'est tout de même vu gêné par un problème majeur : leur **importante immunogénicité** (85) se traduisant en pratique par un défaut de persistance de l'expression du transgène : l'administration des vecteurs délété E1 amène en effet une diminution progressive des taux de facteur synthétisé, sur une période de plusieurs mois (pour les souris C57/B16) ou de plusieurs semaines (dans les autres lignées de souris et chez les lapins et les chiens).

Ce phénomène associé à une réponse inflammatoire se retrouve dans une grande majorité des expériences, les quelques exceptions à ce phénomène étant les études sur les animaux nouveaux nés ou immunodéficients.

En fait deux mécanismes semblent être en cause pour concourir à cette diminution progressive des taux de facteur IX :

- une réponse cellulaire cytotoxique décrite ci-dessous,
- une réponse humorale sur laquelle nous allons revenir.

☆ réponse cellulaire cytotoxique dirigée contre les épitopes
adénoviraux (17, 62, 85)

Il s'agit d'une réponse immune :

- ayant lieu uniquement dans les essais *in vivo*,
- médiée par les lymphocytes T cytotoxiques,
- et attaquant les cellules infectées par l'adénovirus.

On suppose en fait que les cellules contenant le génome recombinant expriment des protéines virales malgré l'absence des gènes E1a et E1b. Ce phénomène (qui pourrait se faire via une transactivation par des facteurs cellulaires E1-like ou par une expression basale des promoteurs de l'adénovirus) conduirait à la stimulation d'une réponse immune pathologique spécifique du virus amenant la destruction des hépatocytes génétiquement modifiés, une hépatite massive et la repopulation du foie par des hépatocytes vierges de tout transgène.

Cette hypothèse est soutenue par des essais montrant que l'administration de ciclosporine A, ainsi que la déplétion en lymphocyte T CD4 par divers agents bloquants augmentent significativement l'expression quantitative du transgène et sa durée.

Bien qu'existante, cette réponse semble toutefois relativement faible dans le cas du facteur IX (61) : les auteurs ont effectivement prouvé l'existence d'une réponse immunologique spécifiquement dirigée contre les épitopes viraux (étude de la réponse CTL après injection du vecteur AdhFIX démontrant que les splénocytes de souris immunocompétentes C57/B16, C3H... sont capables de lyser efficacement les cellules infectées par AdlacZ). Leurs données concernant le maintien de l'ADN viral et l'observation de niveaux élevés de facteur IX chez les souris C57/B16 suggèrent cependant que cette réponse cytotoxique est insuffisante pour entraîner l'élimination des cellules transduites ; une proportion non négligeable de ces dernières persiste en effet pendant au moins deux mois.

D'après ces travaux et certaines données récemment publiées, il apparaît donc que certains transgènes (Cf. β -galactosidase) sont capables d'induire une forte réponse CTL (d'où une élimination des cellules transduites), alors qu'au contraire l'expression d'autres transgènes (tel le facteur IX humain ou canin)... est relativement stable et corrélée à une bonne persistance à court terme des cellules transduites .

La disparition des cellules infectées est en conséquence déterminée de manière prépondérante par la nature du transgène plutôt que par les antigènes adénoviraux eux-mêmes.

Dans le cas du facteur IX, un autre type de réponse immune semble donc agir de façon importante : la réponse anticorps ou réponse humorale.

☆ réponse humorale dirigée contre les épitopes viraux (11)

L'administration des vecteurs AdhFIX induit chez toutes les souris immunocompétentes le développement d'anticorps neutralisants dirigés **contre les particules virales** et bloquant toute possibilité de réadministration efficace des vecteurs.

Des études d'immunosuppression transitoire montrent toutefois qu'une administration ponctuelle d'anticorps anti-CD4 concomitante à l'injection virale autorise une réadministration ultérieure efficace du vecteur (inhibition de la synthèse d'anticorps). Dans des conditions expérimentales similaires, d'autres immunosuppresseurs (FK 506, ciclosporine) se montrent au contraire sans effet notable.

☆ réponse humorale dirigée contre les épitopes du facteur IX (11)

Des anticorps dirigés contre le facteur IX humain sont également induits chez toutes les souris immunocompétentes analysées, à l'exception des souris C57B1/6. Il est intéressant de noter que cette absence d'anticorps est en parfaite corrélation avec la persistance de détection de la protéine humaine chez cette souris.

Supposant fortement que s'il n'y avait pas développement de cette réponse immune, l'emploi d'adénovirus permettrait des résultats très prolongés, les essais se sont poursuivis dans le but :

- de confirmer cette hypothèse (injection en parallèle de produits immunosuppresseurs, travail avec des animaux immunodéficients),
- de résoudre le problème (modification du génome viral afin de diminuer l'expression des protéines virales).

Ceci a ainsi mené à la **fabrication d'adénovirus de plus en plus délétés** (41), avec l'espoir que ces délétions réduiraient l'expression des gènes viraux et donc la réponse immune de l'hôte. La synthèse de virus avec des gènes de transcription précoce tels que E2 et E4 altérés ou supprimés, et dernièrement la synthèse d'adénovirus ne contenant aucun gènes viraux à donc été réalisée : les expériences utilisant des adénovirus de deuxième génération ou plus sont décrites dans la littérature dès 1996 (17).

Un adénovirus délété E1, E3 a ainsi été employé sur des souris CD1 en 1996 (79). Les taux de facteur IX mesurés ont été assez faibles (pic à 140 µg/ml, puis décroissance) mais détectés cependant pendant plus de 3 mois (malgré la souche de souris utilisée). Chez des souriceaux nouveau-nés, une seconde injection a même été suivie d'une nouvelle synthèse de facteur IX (ce qui n'est pas le cas chez l'adulte), permettant d'accroître et de prolonger l'expression du transgène.

Conclusion : le transfert de gène médié par l'adénovirus a été caractérisé par des succès variables sur la souris (en fonction des souches employées et des doses injectées) et par des expressions hautes mais transitoires chez le chien. Cependant l'efficacité de l'injection et une réadministration ultérieure du vecteur restent limitées par les problèmes immunitaires et l'hépatotoxicité déclenchée ; l'adénovirus semble pour l'instant ne pas être le vecteur idéal.

3/ Virus Adéno-Associés (ou AAV) (41)

Ce groupe de vecteurs récemment mis au point offre les avantages des adénovirus (infection des cellules en division lente, dont les hépatocytes) et des rétrovirus (intégration au chromosome hôte et expression prolongée), et semble actuellement très prometteur. Les expérimentations réalisées sur les AAV portent sur les deux tissus cibles encore en course dans les essais de thérapie génique : les tissus musculaires et hépatiques.

3.1/ études sur les animaux sains

☆ tissu musculaire

Les premiers essais concernant l'hémophilie B et ayant lieu sur des animaux sains ont visé le tissu musculaire. Celui-ci répond en effet à deux conditions préalables :

- la synthèse efficace du facteur IX y est possible ,
- l'efficacité du transfert de gène de l'AAV vers le tissu musculaire a été prouvé pour d'autres protéines.

Il restait donc à savoir si cette technique était applicable au facteur IX, autrement dit savoir si elle permettait une sécrétion suffisante du facteur dans la circulation sanguine et l'obtention d'un taux thérapeutique.

Afin de vérifier cet espoir, HERZOG et ses collaborateurs (35, 1997) ont ainsi injecté par voie IM un AAV équipé du promoteur CMV à des souris de souche C57/Bl6 (donc immunocompétentes, et chez lesquelles une relative tolérance immunogénique existe par voie IV mais est annulée par voie IM). Les résultats ont montré une **expression stable du facteur IX** (mise en évidence des ADN et ARN correspondants et détection de facteur IX dans les fibres musculaires et espaces intermusculaires) et ce **pendant plus de trois mois**,

mais sans que celui-ci ne soit pour autant détecté dans la circulation systémique. Cette absence de facteur IX dans le sang a été expliquée par la présence d'anticorps circulants dans le sang des animaux.

Pour confirmer la responsabilité de ces anticorps dans le phénomène, le même vecteur a d'ailleurs été injecté à des **souris immunodéficientes** (35) ; des taux sanguins stables (290 ng/ml soit environ **6% des taux plasmatiques normaux**) ont été observés pendant plus de 21 semaines, prouvant l'efficacité de la voie IM et autorisant le passage d'une forme d'hémophilie sévère à une forme modérée (ce qui serait un bénéfice très important pour un patient humain).

Les mêmes auteurs ont réussi en 2000 (34) à obtenir des résultats similaires (6% des taux normaux pendant plusieurs semaines suite à l'injection IM d'adénovirus chez la souris), mais par l'administration de doses de vecteurs 2 à 4 fois plus faibles. Ce résultat, permis grâce à l'association des promoteurs et amplificateurs CMV et HSA, peut paraître anodin.

L'abaissement des doses permet cependant :

- de limiter une éventuelle distribution du vecteur hors du muscle et donc de prévenir sa diffusion aux cellules cérébrales et sexuelles notamment, réduisant ainsi certains risques de la thérapie génique,
- d'espérer une diminution de la réponse immune.

Nota : Comme dans les expériences sur les souris C57/Bl6 employant les adénovirus, ce problème de réponse immune ne semble pas se retrouver dans les expérimentations utilisant une voie d'injection intraveineuse (donc une cible hépatique) : en 1997(74) des taux thérapeutiques avoisinants les 2000 ng/ml ont pu être maintenus pendant plus de 8 mois chez ce type de souris.

☆ tissu hépatique

En ce qui concerne le foie, les premières études tendaient à montrer une inefficacité des AAV dans la transduction hépatique, à moins que leur injection ne s'accompagne de certaines stratégies de stimulation du renouvellement hépatique comme l'irradiation (51, 1997).

Il est maintenant clair qu'une partie au moins de cette inefficacité était directement due à l'usage du promoteur CMV, assez actif dans le muscle, mais dont l'action semble être très diminuée dans le foie. Deux rapports - voir ci-dessous - ont en effet clairement démontré que l'injection par la veine caudale d'un AAV exprimant le facteur IX humain à partir d'un **promoteur adéquat** permettait une transfection de 3 à 5% des hépatocytes se traduisant, aux doses maximales de vecteurs utilisés, par des taux de facteur IX circulant compris entre 1 et 3 µg/ml de plasma (soit **20 à 60% des taux normaux**).

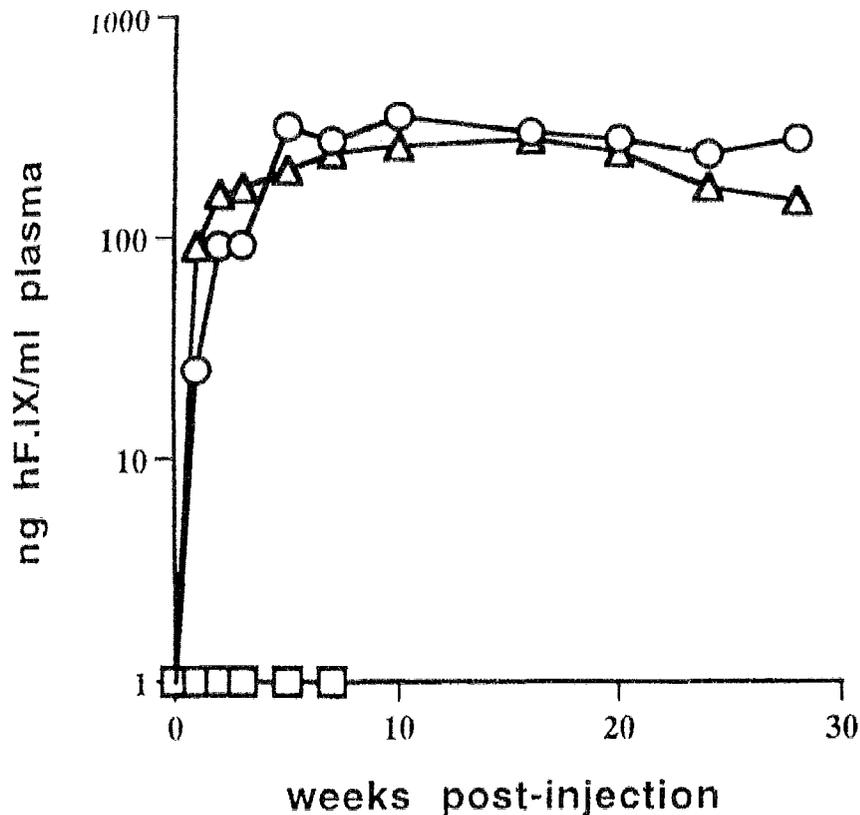
- Dans la première étude (72, 1997), les auteurs ont fait usage du **promoteur MFG** pour exprimer le facteur IX chez des souris C57/Bl6. Le transfert de gène associé a permis une expression stable du transgène pendant plus de 8 mois (250 à 2000 ng/ml selon les souris).
- Dans la seconde étude (63, 1998), c'est le choix d'un **promoteur EF1 α** qui a été fait (souche de souris C57/Bl6, injection intra-portale) et qui a permis la détection du facteur dans le sang pendant plus de 30 semaines à des taux avoisinant 300 ng/ml (des taux de facteur supérieurs à 3000 ng/ml ont été obtenus dans la même expérience avec des doses plus importantes de vecteurs). Les mêmes auteurs ont parallèlement pratiqué une expérience semblable mais avec un vecteur porteur du promoteur CMV : aucune synthèse de facteur IX n'a été détectée, ce qui prouve bien l'inefficacité du promoteur CMV dans les études ciblant le tissu hépatique.

Ces deux expériences montrent donc, malgré le faible pourcentage d'hépatocytes transfectés, une synthèse importante de facteur IX, suggérant ainsi que la transfection de 5% des hépatocytes peut amener une synthèse protéique équivalente à 40% des taux normaux.

3.2/ cinétique d'apparition sanguine du facteur IX

Tous ces essais, aussi bien hépatiques que musculaires, employant des AAV, présentent une cinétique semblable d'apparition du facteur IX dans le sang, se traduisant en pratique par un taux initialement faible, suivi d'une augmentation lente et progressive, puis de l'obtention après 5 à 8 semaines d'un plateau long et stable.

Fig 22. D'après Nakai, 1998, (63) : Cinétique d'apparition du facteur IX suite à l'injection d'AAV recombinant chez 2 souris (Δ et O) traitées par voie intraportale (injection d'environ 1.10^{11} vecteurs par souris). La troisième souris (\square) n'a pas été traitée.



Cette lente apparition du facteur IX a lieu en parallèle avec la disparition (tests de détection génomiques) de la forme d'ADN simple brin injecté (les AAV sont pourvus d'un ADN monocaténaire) et l'apparition de molécules de haut poids moléculaire : tout se passe comme si la conversion progressive du génome de l'AAV en forme double brin transcriptionnellement active était responsable de la faible expression mesurée dans la circulation sanguine et du temps plus long nécessaire à l'obtention d'un niveau optimal.

Cet ADN double brin détecté dans les tests génomiques comme molécule de haut poids moléculaire est en fait retrouvé en grande partie sous forme de concatémères en tête à queue dont la formation passerait par des intermédiaires circulaires. Des études récentes suggèrent que dans le muscle au moins, une grande partie de ces concatémères persisterait sous forme épisomale. Au contraire l'analyse de l'ADN des hépatocytes transfectés semble montrer l'intégration au chromosome hôte de ces concatémères.

3.3/ études sur les animaux hémophiles

Prenant la suite des études sur les animaux sains, les essais sur des modèles hémophiles (chien, souris) ont été mis en route dès 1998. Quatre d'entre eux ont depuis été publiés : le premier portant sur la souris, les trois autres sur le modèle canin.

☆ essai sur la souris

Cet essai (72) a utilisé des souris hémophiles d'ascendance C57/Bl6 traitées par une injection intra-portale d'AAV (promoteur MFG). Il a montré une correction phénotypique (dépendante des doses de vecteurs administrées) pendant au moins 17 semaines, avec une normalisation complète des paramètres de coagulation chez les animaux exprimant plus de 25% des taux humains normaux.

Une approche similaire mais utilisant le promoteur LSP a abouti, elle, à l'expression de taux supérieurs à 1,5 µg/ml pendant plus de 22 semaines (81).

☆ essais sur le chien

Les trois études réalisées sur le modèle canin ont utilisé l'AAV comme moyen de délivrance du facteur IX canin.

Ce passage du modèle murin au modèle canin correspond à une multiplication de l'échelle de poids par 400 à 800. Elle permet d'une part la transposition des essais et des méthodes à de gros animaux plus proches de l'homme, et d'autre part une appréciation plus réaliste des problèmes de réponse immune, efficacité, toxicité...

Cette transposition a été réalisée par trois équipes :

La première (37) s'est intéressée à la voie intramusculaire en utilisant un promoteur CMV, les deux autres (35, 80) ont étudié la cible hépatique (voie intra portale) en utilisant un promoteur MFG ou LSP. Les trois études ont montré une expression systémique prolongée ainsi qu'une absence de toxicité tissulaire (dosages enzymatiques, biopsies...).

- Dans l'étude menée par KAY (73) (voie IV, promoteur MFG), les taux mesurés correspondaient à **1% des taux normaux** (pour une injection de 2.10^{12} AAV par chien). Bien qu'ils puissent sembler faibles, ils ont été maintenus pendant **plus 8 mois** et ont permis une amélioration partielle des paramètres de coagulation (WBCT, APTT), les taux d'expression étant dépendants des quantités de vecteurs injectés. Un autre intérêt de cette étude est le constat de l'absence apparente de réponse immune neutralisante contre le vecteur ou le produit du transgène, problème jusqu'alors rencontré avec les autres systèmes de vecteurs.
- Dans l'étude de VERMA (80) (voie IV, promoteur LSP ; $8,7.10^{13}$ AAV par chien), les taux mesurés (**5% des taux normaux pendant plus de 7 mois**) ont été pour la première fois accompagnés d'une correction phénotypique partielle : une diminution partielle ou complète des épisodes de saignements spontanés ou traumatiques a été notée (en parallèle

à une diminution importante des WBCT et aPTT). Ici aussi, aucune réponse immune n'a été observée, confirmant la faible immunogénicité des AAV injectés par voie IV

- Dans l'étude de HIGH (37) (voie IM), l'injection de $6,5 \cdot 10^{13}$ particules d'AAV par chien à permis une correction phénotypique partielle pendant **plus de 16 mois**, sans signe de déclin des taux sanguins. Ce résultat laisse supposer que l'injection de $1 \cdot 10^{13}$ AAV/kg permettrait l'obtention de taux stables équivalents à **1 ou 2% des taux normaux**. Cette étude amène aussi une réponse intéressante aux problèmes des inhibiteurs générés contre les produits du transgène.

Dans une étude précédente (36, 1998), l'injection par voie IM d'AAV portant le gène du facteur IX humain à des chiens hémophiles s'était en effet traduite par le développement d'une réponse immune (ce qui n'est pas surprenant puisque ces chiens développent cette même réponse lorsqu'ils sont traités par injection de facteur IX recombinant humain). Au contraire dans l'étude de HIGH, le transgène était spécifique de l'espèce étudiée : AAV porteur du gène du facteur IX canin injecté à des chiens hémophiles. Ceci explique l'importante différence de réponse immune observée : dans l'étude de HIGH, un seul des cinq chiens a développé des anticorps, et ce de façon transitoire, pendant seulement les deux premiers mois suivant l'injection. De plus, ces anticorps ne sont pas réapparus après réinjection du vecteur, ni après traitement par du facteur IX canin et ne seraient donc pas un facteur limitant à la thérapie génique par AAV.

Conclusion : Employé depuis 1997 dans des expériences sur l'hémophilie B, l'AAV permet donc une expression très prolongée du transgène (plus de 1 an). Les taux de facteurs IX plasmatiques obtenus chez l'animal demeurent cependant généralement encore trop faibles, ce qui n'a pourtant pas empêché une équipe de commencer un essai clinique de phase 1 sur l'homme (voir partie essais sur l'homme).

Implication pour une thérapie génique à l'homme :

Contrairement aux injections intra-portales, le protocole intramusculaire d'injection de vecteur par voie percutanée, est bien supporté par les chiens hémophiles et ceci sans que l'injection en parallèle de plasma normal ou de concentré de facteur ne soit nécessaire. L'accessibilité de la masse musculaire, la relative sécurité et la simplicité de la procédure sont de même en faveur de cette voie (en cas de problème on peut toujours retirer le morceau de muscle traité) ; l'importante prévalence de maladies hépatiques (hépatites B et C) parmi les adultes atteints d'hémophilie A sévère représente un argument de plus pour faire de la voie IM une stratégie attractive.

Cependant, une étude récente (66) montre que dans le cas des AAV, pour une même dose de vecteur injecté, la voie IP se révèle 4 fois plus efficace que la voie IM, offre un risque de développement d'inhibiteurs beaucoup plus faible (voir quasiment nul), et laisse espérer une expression beaucoup plus prolongée (de par l'intégration des concatémères aux chromosomes des hépatocytes). Trois arguments qui sont tout de même assez attractifs.

La voie IV se révèle dans cette étude aussi très intéressante : le tissu ciblé reste le foie (tropisme des AAV), ce qui assure une intégration chromosomique ; de plus l'apparition d'inhibiteurs reste faible, et les taux de facteurs mesurés atteignent 60 à 80% de ceux obtenus par voie IP. Ceci est d'autant plus intéressant d'un point de vue pratique, que l'administration chez l'homme par l'artère hépatique via un cathéter percutané est une procédure moins complexe et moins risquée que l'injection intra-portale.

Tableau 9. facteurs IX : bilan des études présentées dans le tableau 8.

	Problèmes rencontrés avec le fIX	Résultats obtenus sur le fIX
Rétrovirus	<p>Synthèse d'anticorps contre la protéine humaine (hfIX)</p> <p>⇒ études sur des souris immunodéficientes</p> <p>⇒ mise au point du gène codant pour le facteur canin</p> <p>inactivation des promoteurs viraux = usage de promoteurs cellulaires</p>	<p>6 essais présentés (1989-1998)</p> <p>Assez efficace chez la souris, mauvais résultats sur le chien.</p> <p>Etudes sur les fibroblastes, myoblastes, keratinocytes...</p>
Adénovirus	<p>Expression trop transitoire = problèmes de réponse immune</p> <p>⇒ injection par voie IV à des souris C57/B16</p> <p>⇒ emploi du fIX canin</p> <p>⇒ usage d'un promoteur adéquat (CMV)</p> <p>⇒ synthèse d'adénovirus de plus en plus délétés</p> <p>Impossibilité de réadministrer le vecteur</p>	<p>4 essais présentés (1994-1998)</p> <p>Résultats variables chez la souris,</p> <p>expression haute mais transitoire chez le chien, taux facilement équivalent à 200% des taux normaux.</p> <p>Etudes sur la voie IV et intraportale : tropisme hépatique.</p>
AAV	<p>Promoteur CMV inefficace sur le foie.</p> <p>⇒ usage d'un promoteur adéquat</p> <p>Synthèse d'anticorps contre la protéine humaine:</p> <p>⇒ utilisation de souris C57/B16 pour les injections par voie IV</p> <p>⇒ utilisation de souris immunodéficientes pour les injections par voie IM</p>	<p>10 essais présentés (1997-2001)</p> <p>quelques % des taux normaux pendant plus de 1 an chez le chien et la souris</p> <p>études sur la voie IV, intraportale et IM</p>

-Chapitre 2-

***expériences utilisant
des vecteurs viraux
pour traiter
l'hémophilie A***

Comparativement au facteur IX, le gène codant pour le facteur VIII et la protéine elle-même sont beaucoup plus grands. Ceci débouche d'un point de vue pratique sur deux problèmes :

- impossibilité d'incorporer la totalité du gène dans un vecteur : pour cette raison la plupart des expérimentations utilisent non pas le gène entier mais le gène délété du domaine B encore appelé gène BDD (B domain Deleted), et dont la taille est suffisamment petite pour permettre son intégration dans tous les vecteurs.
- doute sur la capacité des différents tissus et cellules à excréter la protéine néosynthétisée dans le sang.

Pour ces raisons, les expériences sur le facteur VIII ont été peu mises en route durant les premières années de développement de la thérapie génique, ceci au profit des études sur le facteur IX, plus facile à manipuler.

Cependant, compte tenu de l'incidence beaucoup plus élevée de l'hémophilie A, chercheurs et laboratoires multiplient depuis déjà quelques années les expériences sur cette maladie actuellement devenue un objet de recherche majeur.

Le principe de l'avancée des expériences est similaire à celui développé pour les études sur l'hémophilie B, à savoir au début des études *in vitro* (pour s'assurer que le facteur est bien synthétisé et ce sous forme active dans différents types de cellules et qu'il rejoint la circulation sanguine), puis des études *in vivo* sur l'animal, hémophile ou non, avec l'intégration dans les études des différents vecteurs apparus au cours des années : rétrovirus, puis adénovirus et enfin AAV.

Comme nous allons le voir, les obstacles au développement d'une thérapie génique pour l'hémophilie A ont été nombreux, et ce malgré les connaissances déjà acquises grâce aux études sur le facteur IX et sur d'autres gènes thérapeutiques.

Comme précédemment (voir partie 4) , un tableau récapitulatif d'une douzaine d'expériences sur l'animal (thérapie génique pour le facteur VIII par usage de vecteur viraux), est proposé dans les pages qui suivent. Un texte explicatif, reprenant l'évolution des idées et des connaissances apportées par chaque expérience intéressante de ce point de vue, figure suite à ce tableau.

-Chapitre 2-

***expériences utilisant
des vecteurs viraux
pour traiter
l'hémophilie A***

Comparativement au facteur IX, le gène codant pour le facteur VIII et la protéine elle-même sont beaucoup plus grands. Ceci débouche d'un point de vue pratique sur deux problèmes :

- impossibilité d'incorporer la totalité du gène dans un vecteur : pour cette raison la plupart des expérimentations utilisent non pas le gène entier mais le gène délété du domaine B encore appelé gène BDD (B domain Deleted), et dont la taille est suffisamment petite pour permettre son intégration dans tous les vecteurs.
- doute sur la capacité des différents tissus et cellules à excréter la protéine néosynthétisée dans le sang.

Pour ces raisons, les expériences sur le facteur VIII ont été peu mises en route durant les premières années de développement de la thérapie génique, ceci au profit des études sur le facteur IX, plus facile à manipuler.

Cependant, compte tenu de l'incidence beaucoup plus élevée de l'hémophilie A, chercheurs et laboratoires multiplient depuis déjà quelques années les expériences sur cette maladie actuellement devenue un objet de recherche majeur.

Le principe de l'avancée des expériences est similaire à celui développé pour les études sur l'hémophilie B, à savoir au début des études *in vitro* (pour s'assurer que le facteur est bien synthétisé et ce sous forme active dans différents types de cellules et qu'il rejoint la circulation sanguine), puis des études *in vivo* sur l'animal, hémophile ou non, avec l'intégration dans les études des différents vecteurs apparus au cours des années : rétrovirus, puis adénovirus et enfin AAV.

Comme nous allons le voir, les obstacles au développement d'une thérapie génique pour l'hémophilie A ont été nombreux, et ce malgré les connaissances déjà acquises grâce aux études sur le facteur IX et sur d'autres gènes thérapeutiques.

Comme précédemment (voir partie 4) , un tableau récapitulatif d'une douzaine d'expériences sur l'animal (thérapie génique pour le facteur VIII par usage de vecteur viraux), est proposé dans les pages qui suivent. Un texte explicatif, reprenant l'évolution des idées et des connaissances apportées par chaque expérience intéressante de ce point de vue, figure suite à ce tableau.

Tableau 10 : Expression du facteur VIII in vivo

référence	vecteur	animal	méthode	Durée de l'expression	Taux maximal de fVIII
(38) 1992	Rétrovirus BDD hfVIII	Souris non hémophiles N= 30	Transplantation de $2,5.10^4$ à 5.10^5 cellules de moelle osseuse génétiquement modifiés à des animaux fortement irradiés	0	0
(89) 1994	Adénovirus CMV promoteur Intron de synthèse BDD hfVIII	Souris non hémophiles N = 6	Implantation intrasplénique de 1.10^6 fibroblastes murins transfectés	48h	8.5 à 17.4 ng/ml M= 13.7ng/ml
(16) 1995	Retrovirus MFG hfVIII	SCID mice N= 3	Implantation intrapéritonéale de 3.10^7 fibroblastes humains entourés d'une matrice de collagène	10 jours	Pic à J2 : 110, 120 et 60 ng/ml M= 93 ng/ml
(77) 1999	Retrovirus MFG CMV promoteur MLV promoteur Pseudotypé par VSV-G h BDD f VIII	Souris hémophiles & C57/Bl6 agées de 2-3 jours N= 13	Injection IV par le plexus retro-orbital sur deux jours consécutifs De $0,9$ ou $1,4.10^8$ vecteurs/souris = voie IV systémique	Plus de 62 semaines Expression stable, en plateau	7 souris = 0 mU/ml présence d'anticorps 2 souris = 200 à 500 mU/ml 4 souris = 500 à 12500mU/ml correction phénotypique chez 5 des 6 souris
(14) 1996	Adenovirus délété E1, E3 (g1) Albumin promoteur Intron Apo A1 humain BDD hfVIII	Chiens hémophiles N= 3	Injection unique par la veine céphalique périphérique Chien A : 3.10^{10} vecteur/kg Pas d'immunosuppression Chien B : $1,5.10^{10}$ vecteur/kg Immunosuppression par cyclophosphamide + corticoïdes Chien C : 3.10^{10} vecteur/kg Immunosuppression par ciclosporine A	7 jours 15 jours 0 jours	Aux environs de J2 8050 mU/ml 305mU/ml 0

(12)	1996	Adenovirus (g1) Mouse albumin promoteur Intron apo A1 humain BDD hfVIII	Souris non hémophiles N= 25	Injection unique par la veine caudale Groupe 1 : $4 \cdot 10^9$ vecteur/souris Groupe 2 : $1 \cdot 10^9$ vecteur/souris Groupe 3 : $5 \cdot 10^8$ vecteur/souris Groupe 4 : $2 \cdot 10^8$ vecteur/souris Groupe 5 : $5 \cdot 10^7$ vecteur/souris	17 semaines : expression importante puis décroissance rapide a 4 semaines idem 22 semaines d'expression à taux thérapeutique pic moins fort, dure plus longtemps idem pas de pic, plateau long	2063 ng/ml 438 ng/ml 397 ng/ml 168 ng/ml 75 ng/ml
(10)	1998	Adenovirus Ad1 : délété E1, E3 (g2) Intron apo A1 humain BDD fVIII Ad3 : délété E1, E2a, E3 (g3) Intron Apo A1 humain BDD fVIII	Souris hémophiles : Souche C57/B16 & exon 17 N= 12	Injection unique par la veine caudale 4 souris avec Ad1 : $4 \cdot 10^{10}$ vecteurs/souris 8 souris avec Ad3 : $6 \cdot 10^{10}$ vecteurs/souris survivance au tail clipping : 20 souris non hémophiles 40 souris hémophiles non traitées 23 souris hémophiles traitées	Maximum après 1 à 2 semaines Persistance de taux thérapeutiques pendant plus de 40 semaines 20 survivants 6 survivants 23 survivants	2100 mU/ml 2500 mU/mL
(26)	1999	Adenovirus délété E1, E2a, E3 (g3) Mouse albumin promoteur Intron apo A1 humain Canine 3' UTR Canine BDD fVIII	Souris hémophiles exons 17 N= 10	Injection par la veine caudale de $6 \cdot 10^{10}$ vecteurs/souris Nb : experience en parallèle avec fVIII humain : expression de taux thérapeutique pdt 50 semaines mais à des taux 10 fois plus faibles	Pic dès le début puis diminution des taux pendant 1 à 3 mois et stabilisation pendant plus de 50 semaines à 1000 mU/ml	Pic 12 000 mU/ml Plateau : 1000 mU/ml

(90)	1999	Mini Ad virus (g4) h Albumine promoteur h FL fVIII	Souris hémophiles & C57/B16 ? N = 8 Souris C57/B16 N= 16	Injection unique par la veine caudale de 1.10^{11} vecteurs/souris	Plus de 54 semaines pour 3 des souris, Anticorps chez les autres. Plus de 30 semaines pour toutes les souris	100 à 800ng/ml pendant plus de 369 jours correction phénotypique
(11)	1999	Adenovirus délété E1, E2a, E3 (g3) Albumin promoteur Intron apoA1 humaine h BDD fVIII Ou h FL fVIII	Souris hémophiles Exon 16 ou 17 N= 28 N=6	Injection unique par la veine caudale 6.10^{10} vecteur/souris $1,3.10^{11}$ vecteur/souris	Non mesuré	Souris BDD : 1155mU/ml (J15) Souris FL < 1% (J15) Souris BDD : 4469mU/ml (J7) Souris FL : < 1% (J7) Correction phenotypique chez les souris BDD et FL !!!
(3)	2000	Mini Ad virus (g4) Human albumin promoteur Intron SV 40 h FL fVIII	Souris C57/B16 N= 3 Souris hémophiles N= 8	Injection unique par la veine caudale de 2.10^{11} vecteurs/souris	Plus de 48 semaines Plus de 1,5 an Pour une souris Pour les autres : expression transitoire allant de 3 à 20 semaines	Plateau à 200 ng/ml Puis décroissance après 150 jours Plateau à 500ng/ml Puis décroissance après 200 jours
(27)	2001	Adenovirus délété E1, E2a, E3 (g3) Albumin promotor Intron apoA1 humaine c BDD fVIII	Chiens hémophiles N = 2 N = 2	Injection unique par la veine céphalique de : 3.10^{12} vecteurs/chien 5.10^{11} vecteurs/chien	Expression du fVIII mesurée pendant : Moins de 10 jours Moins de 15 jours	Réponse immunes, toxicité hépatiques et sanguines importantes. Pic à 20 000 et 6000 mU/ml Pic à 1500 mU/ml pour les 2

(9) 2000	Adeno Associated Virus Herpes TK promoteur Hépatite B virus enhancer H BDD fVIII	Souris C57/B16 N= 2 N= 4 Souris SCID N= 4	Injection unique par la veine porte De $2 \cdot 10^{10}$ vecteurs/souris De $2 \cdot 10^{11}$ vecteurs/souris De $1,5 \cdot 10^{11}$ vecteurs/souris	Plus de 50 semaines	6 à 9 ng/ml 40 ng/ml 55ng/ml
----------	--	---	---	---------------------	--

Expériences EX VIVO

Comme pour l'hémophilie B, l'emploi d'une thérapie *ex vivo* pour l'hémophilie A demande que la méthode permette (13) :

- une expression prolongée du facteur,
- une durée de vie suffisante des cellules,
- un passage du facteur dans la circulation sanguine.

Compte tenu du volume de distribution du facteur VIII chez l'adulte et de sa demie-vie, il a de plus été estimé pour ces études *ex vivo* (en supposant que tout le facteur synthétisé passe dans la circulation sanguine), (13) que des cellules produisant la protéine à des taux de $30 \mu\text{g}/10^9$ cellules/24h assureraient un taux plasmatique de facteur VIII de 5ng/ml et seraient donc aptes à permettre la conversion d'une forme d'hémophilie sévère en une forme modérée.

1/ RETROVIRUS : un début de développement peu prometteur

Les rétrovirus ont été de loin les véhicules de transfert les plus employés dans les études *ex vivo*. Comme nous l'avons vu, ils ont l'avantage de pouvoir infecter un large spectre de cellules et d'intégrer leur ADN de façon stable au chromosome hôte, permettant ainsi le passage du gène transfecté aux cellules filles. Ils nécessitent cependant pour cela des cellules en division active et leur champ d'action se limite donc, en théorie, à certains tissus :

- muscles via la greffe de myoblastes,
- peau via la greffe de fibroblastes.

La faisabilité du transfert de gène par les rétrovirus et la réalité de l'expression protéique *in vitro* ont en fait été prouvées dès 1990 par la **transfection de fibroblastes**. Ces cellules, qui ont été les premières testées à cause de leur facilité de manipulation, ont toutefois vu leur utilisation gravement entravée par des difficultés de développement.

La première de ces difficultés (et non des moindres puisqu'elle a justifié plusieurs années de recherche) étant que l'expression protéique, bien que réelle, avait lieu à des taux très insuffisants pour permettre d'envisager une poursuite des études par implantation des cellules génétiquement modifiées à l'animal : le simple fait d'intégrer le transgène dans le vecteur suffisait à faire diminuer brutalement les titres de ce dernier et l'expression du transgène (13).

Cette impossibilité d'obtenir *in vitro* et à haut titre un rétrovirus exprimant le facteur VIII, est imputé à la **présence dans le gène du facteur VIII lui-même de séquences d'ADN inhibitrices** (20) (notamment présence, dans la région A2 du gène, de séquences capables de fixer des composants cellulaires inhibiteurs de transcription) qui empêcheraient l'accumulation de l'ARN_m (20, 1995). Ceci aurait pour conséquence directe de diminuer, et les titres du vecteur, et l'expression du facteur VIII, et expliquerait ainsi pourquoi l'introduction du gène dans le virus est brutalement suivie d'une diminution importante des titres viraux (41).

D'autres problèmes, eux aussi spécifiques du facteur VIII, ont été à prendre en compte pour l'obtention d'une thérapie génique efficace. En effet, cette protéine (11) :

- est pourvue d'un transport intracellulaire très peu efficace,
- une fois sécrétée devient très sensible à la dégradation enzymatique et nécessite pour être stabilisée de pouvoir se lier au facteur von Willebrand .

Dans le but d'augmenter les titres des vecteurs et l'expression du facteur VIII, plusieurs idées ont alors été testées *in vitro* :

1- **Suppression des séquences d'ADN supposées inhibitrices.** Ces essais ne se sont pas traduits par une amélioration de l'expression protéique (13).

2- **Usage de promoteurs dotés d'une spécificité tissulaire**

1- **Suppression des marqueurs** : on considérait en effet au début que la présence d'un marqueur, en général de résistance à la néomycine, était indispensable pour détecter la présence dans les cellules de l'ADN vectoriel transfecté. Or il s'est avéré que certains marqueurs pouvaient (suite à leur toxicité ou immunogénicité) diminuer l'expression du gène par interférence avec le promoteur. Avec la venue de méthodes de dosage basées sur les séquences virales (1996), il est aujourd'hui possible de créer des vecteurs sans marqueur, et de permettre une expression du facteur VIII à long terme et à des taux importants ; des taux de l'ordre de $1\mu\text{g}/10^6\text{cellules}/24\text{heures}$ ont ainsi été obtenus.

4- **Ajout d'un intron permettant l'épissage de certaines séquences virales** (13, 41, 44).

Cet ajout a permis un progrès significatif dans la production à haut titre des rétrovirus (d'autant plus que les vecteurs utilisés dans ces études dérivent du système MFG, et sont sans marqueurs). Des titres plus acceptables de l'ordre de 1.10^6 vecteur/ml ont ainsi pu être obtenus :

- CHUAH et ses collaborateurs (1995) ont démontré que l'addition d'un intron augmentait de 20 fois l'expression du facteur VIII et de 40 fois les titres viraux.
- DWARKI et son équipe (17, 1995) ont eux généré un vecteur similaire permettant la synthèse de $2000\text{ng}/\text{ml}/10^6$ cellules/24h de facteur VIII par des fibroblastes humains.

Bien que mieux, ceci n'était toujours pas suffisant pour permettre une thérapie génique *in vivo*.

5- **Pseudotypage par VSV-G** : C'est cette dernière étape qui a vraiment permis l'obtention de solutions à haut titre viral ; le pseudotypage du virus par la protéine G du Vesicular Stomatitis Virus, lui permet en fait de supporter l'ultracentrifugation, et donc d'être obtenu en solution plus concentrée (45). Contrairement à beaucoup d'autres, cette enveloppe a l'intérêt de ne pas engendrer l'activation du complément lorsqu'elle est injectée. Elle présente de plus l'avantage de ne pas nécessiter de récepteur spécifique pour entrer dans une cellule. Ce dernier point peut cependant être aussi un inconvénient, d'autant plus que l'enveloppe du VSV-G est susceptible de fusionner avec les membranes et d'être toxique à hautes concentrations.

Les expériences *in vitro* dérivant de ces idées ont donc été nombreuses. Cependant, étant donné les faibles titres de toutes les préparations obtenues, peu d'entre elles ont été poursuivies par une réintroduction de ces cellules dans un organisme... Les premières d'entre elles se sont de plus montrées fort décevantes :

- greffe de progéniteurs myéloïdes (38, 1992) : pas de détection du facteur VIII *in vivo*
- greffe cutanée de fibroblastes (1993) : aucune détection non plus

Si le résultat négatif de la première expérience a pu être expliqué facilement puisqu'il s'est révélé, à posteriori, qu'aucune expression protéique n'était de toute façon déterminée *in vitro* dans la solution injectée, il est resté longtemps plus mystérieux pour la seconde expérience : il y avait bien cette fois une expression *in vitro*. L'explication en a été fournie plus tard lors d'une expérience utilisant les adénovirus :

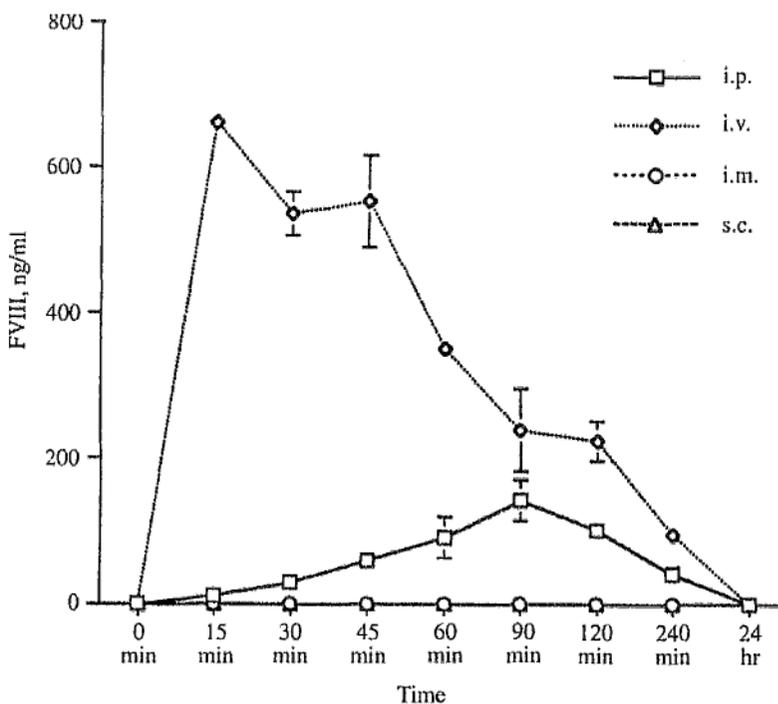
Constatant le faible succès des rétrovirus à l'époque, les auteurs de cette expérience se sont intéressés l'année suivante à un autre médiateur de gènes, l'adénovirus, et ont fait porter leur étude sur la transfection de deux types cellulaires : fibroblastes et myoblastes (89, 1994).

La transfection de ces cellules, normalement faible par ce genre de vecteur (division rapide), a été médiée par un récepteur aux adénovirus et l'expérience reste un succès puisque les taux de facteur VIII ainsi obtenus *in vitro* ont été de 620mU/10⁶cellules/24heures pour les myoblastes et de 1250 mU pour les fibroblastes, soit des taux 10 à 100 fois supérieurs à ceux obtenus à l'époque avec les rétrovirus.

La suite de l'étude se révèle aussi fort intéressante, puisque ces cellules, implantées à la souris au niveau splénique ou hépatique, ont engendré une détection de facteur VIII dans la circulation sanguine et ce à des taux thérapeutiques (mais pendant une journée seulement) ; au contraire, les mêmes myoblastes implantés en intramusculaire (stratégie pourtant reconnue efficace avec le facteur IX) n'ont eux engendré aucune détection du facteur.

L'importance du site de délivrance du facteur VIII s'est vu par la suite confirmée par l'injection toute simple de facteur VIII humain recombinant humain à des souris par quatre voies (16) : SC, IM, IV et IP. Les mesures sanguines effectuées parlent d'elles mêmes :

Figure 23. Dwarki VI, 1995 (16) : Clairance du facteur VIII à partir de plasma murin. Le facteur VIII recombinant a été injecté par diverses voies (100 unités/kg de poids corporel) et les échantillons de plasma récoltés aux temps indiqués. Chaque point est une moyenne des taux mesurés sur au moins 3 animaux.



Ce graphe tend à montrer l'inefficacité des voies IM et SC pour l'administration et la délivrance du facteur VIII.

Suite à ces résultats, il a été supposé que l'inefficacité des voies SC et IM serait due à la protéine de facteur VIII elle-même qui :

- de part sa trop grande taille, se révélerait incapable de rejoindre la circulation sanguine à partir d'un site musculaire ou cutané,
- serait sensible aux protéases situées dans l'espace extracellulaire du muscle et de la peau.

Ce phénomène prendrait toute son importance chez la souris pour laquelle la demi-vie du facteur VIII est réduite (60 min contre 10h chez l'homme).

Ces hypothèses qui expliqueraient les mauvais résultats obtenus jusque là, bloquent aussi les tentatives de recherche dans le domaine des greffes cutanées et musculaires (et pourtant?).

2/ RETROVIRUS : un premier succès

En fait, le premier résultat positif *in vivo* concernant les rétrovirus a été obtenu en 1995 par DWARKI et son équipe (16) qui ont implanté non pas en sous-cutané mais dans la cavité péritonéale de souris atteintes d'immunodéficience sévère combinée, des fibroblastes transfectés par le **rétrovirus MFG** et enrobés d'une matrice de collagène. Cette expérience présente donc plusieurs atouts :

- transfection de fibroblastes = technique maîtrisée et efficace
- rétrovirus MFG = production à haut titre
- implantation intrapéritonéale = pas de problème pour que le facteur synthétisé rejoigne la circulation sanguine
- souris immunodéficientes et matrice de collagène = pas de rejet de la greffe, pas de développement d'anticorps contre les produits du transgène

Comme on pouvait s'y attendre, de **hauts niveaux d'expressions** ont été atteints (100ng/ml à J2) qui n'ont malheureusement pas été maintenus et retournaient à un taux nul après 13 jours. Cette cessation de l'activité a pu être expliquée par le faible nombre de cellules transfectées survivantes dans les implants de collagène et par l'inactivation transcriptionnelle de l'expression de la cassette du facteur VIII. (Durée de vie des fibroblastes?).

3/ RETROVIRUS : autres succès ?

Ce même vecteur (rétrovirus MFG), à priori prometteur, a été plus récemment utilisé pour transfecter *in vitro* des cellules de moelle osseuse et les réimplanter chez la souris (19). Une approche similaire chez le chien a permis la réintroduction de cellules canines de moelle osseuse qui s'est suivie d'une expression transitoire du facteur VIII (41).

Enfin, des études récentes montrent que des implants cutanés exprimant le facteur VIII ont permis de reconstituer la coagulation chez des souris hémophiles et immunodéficientes, ce seulement sous le contrôle d'un promoteur spécifique du derme (22 : abstract, article non publié). On peut cependant se poser des questions sur ce résultat unique qui va à l'encontre de tous les autres (expression du facteur VIII à partir d'un site cutané) et n'a semble t'il donné lieu à aucune publication ultérieure. Sa confirmation permettrait pourtant de relancer les recherches sur les greffes cutanés, idée qui n'est pas inintéressante.

Expériences *IN VIVO*

L'intérêt des méthodes *in vivo* réside dans le fait qu'elles permettraient de baisser les coûts de traitement tout en libérant le patient des procédures chirurgicales plus ou moins invasives induites par la thérapie *ex vivo*. Relativement plus bénignes, sûrement moins chères, elles présentent donc un avantage pour les patients et pour les entreprises de développement.

1 / RETROVIRUS

Comme nous l'avons vu, les problèmes liés au développement des rétrovirus ont été multiples. Pour cette raison, et compte tenu surtout de leur intérêt à priori mineur *in vivo* (transfection uniquement des cellules en division rapide, c'est à dire myoblastes et fibroblastes qui comme nous l'avons vu ne peuvent assurer une libération plasmatique du facteur VIII), on comprend aisément que ces virus n'aient été ni les premiers, ni les plus utilisés des véhicules de transfert pour ces études *in vivo*.

Grâce aux progrès réalisés très récemment dans le développement des rétrovirus (pseudotypage VSV-G), et à la pertinence de certains chercheurs, une expérience sur l'animal hémophile a cependant pu être menée et ce avec succès! (20)

Cette étude (77, 1999) présente le premier résultat, d'une expression prolongée et à taux thérapeutiques de facteur VIII, résultant d'une transfection par un rétrovirus et tombe d'autant mieux qu'un essai clinique utilisant cette technique est actuellement en cours sur l'homme.

Elle utilise une préparation concentrée contenant de haut titres viraux, administrée par une simple injection IV à des souris hémophiles âgées de 2 à 3 jours.

Le résultat est éloquent. Il montre des taux plasmatiques de facteur VIII normaux ou supranormaux, accompagnés d'une correction phénotypique.

L'équipe a de plus montré que la majeure partie de la protéine synthétisée avait une origine hépatique (analyse PCR). Pourtant, comme nous l'avons vu plus haut, l'usage de rétrovirus nécessite le ciblage de tissus en division rapide ; ceux-ci ne sont donc pas efficaces sur le foie. Comment expliquer alors, l'origine hépatique de la protéine ? Tout simplement parce que les auteurs, voulant que cette production ait lieu, ont contourné le problème en utilisant des animaux nouveaux-nés. Contrairement à ceux de l'adulte, les hépatocytes des nouveau-nés sont en effet des cellules en prolifération rapide. Les auteurs ont ainsi estimé avoir transfecté dans leur étude 10 à 60% des hépatocytes.

Bien que très satisfaisant, ce résultat ne peut toutefois être appliqué à l'adulte à moins qu'il n'y ait addition de facteur de croissance ou d'autres stimuli capables d'induire la prolifération hépatocellulaire .

D'autres études menées par GREENGARD et ses collaborateurs ont aussi montré à plusieurs reprises une expression prolongée de facteur VIII suite à l'injection IV à des chiens et lapins de rétrovirus dérivés du système MLV (32). Cette expression n'a systématiquement été mesurée qu'à partir de la 8^{ième} semaine (environ) suivant l'injection. Ce temps de latence correspondrait au temps nécessaire à une transmission du transgène aux cellules filles, ce qui correspond en pratique à une multiplication des cellules infectées. Le manque de publication concernant ces résultats ne permet cependant pas leur interprétation (âge des animaux?), d'autant plus que certaines données demeurent pour l'instant inconnues des auteurs (lieu de production du facteur?).

S'il s'agit là des seules expériences employant des vecteurs rétroviraux, les vecteurs adénoviraux ont été eux -compte tenu de leur mise sur le marché relativement ancienne et de leurs avantages potentiels pour une thérapie génique *in vivo*- bien plus utilisés.

2/ ADENOVIRUS

Comme nous l'avons vu dans les expériences sur l'hémophilie B, leur principal atout, non des moindres, résulte dans leur capacité à pouvoir infecter des cellules en division lente, et donc à permettre une thérapie génique hépatique par exemple. Cet intérêt se voit renforcé par la propriété qu'ont les adénovirus de se concentrer dans le foie suite à une injection IV et d'assurer une transduction très efficace des hépatocytes (14).

Les adénovirus sont de plus aisés à manipuler (amplification et purification facile, concentration à hauts titres possible).

Ils présentent toutefois un défaut majeur : l'induction d'une forte réponse immune ; défaut que les chercheurs se sont efforcés d'atténuer, créant des générations d'adénovirus de plus en plus "sophistiquées" : des progrès considérables ont ainsi été faits récemment dans le développement d'adénovirus porteurs du gène thérapeutique de l'hémophilie A (12, 14) :

2-1 études sur l'animal non hémophile

- L'addition d'un promoteur albumine humain a ainsi permis *in vitro*, à des hépatocytes, de synthétiser du facteur VIII humain actif, à des taux élevés supérieurs à 2400 mU/10⁶cellules/24heures.

L'administration à des souris de ce même vecteur via la veine caudale, s'est traduite par des taux plasmatiques avoisinant les 300ng/ml (taux normal chez l'homme : 200ng/ml), ces taux étant maintenus pendant plusieurs semaines et le facteur secrété étant effectivement actif (13).

- Un autre vecteur, comportant lui un exon non traduit et un intron placé en amont de la région codante du facteur VIII, a permis de multiplier par 10 l'expression protéique *in vivo*. L'injection de ce vecteur à de faibles doses non toxiques, à des souris adultes non hémophiles a ainsi permis l'obtention de taux quatre fois supérieurs aux taux humains normaux pendant plus de 5 mois (12 1996). Au contraire, l'administration de doses plus

fortes et hépatotoxiques a conduit à un déclin rapide de taux plasmatiques de facteur VIII, suggérant que la toxicité dose dépendante du vecteur limite sa propre persistance.

Cette cytotoxicité qui se retrouve aussi dans les expériences employant le promoteur albumine (13), impose la notion d'une marge minimale de sécurité à fixer concernant les doses de vecteurs à employer, particulièrement en vue d'essais sur l'homme.

2-2 études sur l'animal hémophile

2-2-1 vecteurs de 1^{re} et 2^{ème} génération

L'obtention d'une correction complète du phénotype de deux **chiens hémophiles** (14) marque un point fort dans l'histoire des adénovirus et dans leur utilité pour le traitement de l'hémophilie A. Traités par des injections périphériques, les deux animaux ont vu leurs paramètres de coagulation normalisés, et ont exprimé le facteur humain à des taux bien supérieurs aux taux thérapeutiques (pic à 8000mU/ml). Cette expression a été cependant de courte durée, conséquence au moins en partie, du développement d'inhibiteurs contre la protéine humaine.

Par la suite, le développement des recherches sur les adénovirus s'est poursuivi en vue d'obtenir une correction plus longue ; deux idées ont été travaillées :

- **utiliser un vecteur codant pour le gène humain non pas chez le chien mais chez la souris hémophile d'ascendance C57/Bl6**, à priori tolérante à cette protéine.
- **synthétiser un vecteur codant pour la protéine canine**, que l'on sait moins immunogène afin de le tester chez la souris puis sur le chien.

La première de ces idées a pu être testée (10) en 1998, suite à la mise au point (1997) des premiers modèles de souris hémophiles par génie génétique. Les taux sanguins mesurés, initialement très importants (de l'ordre de 900mU/ml) ont décliné progressivement mais tout en restant pendant plus de 9 mois largement supérieurs aux taux thérapeutiques chez la plupart des souris traitées. Toutes les souris traitées (n=23) ont survécu au tail clipping et montré une correction phénotypique. La baisse rapide du facteur VIII chez certaines souris reste cependant inexpiquée : pas de détection importante d'anticorps, pas de réponse CTL, et l'on sait de plus que les souris hémophiles ne développent pas d'anticorps contre la protéine humaine lorsque celle-ci est codée par un adénovirus injecté par voie IV ; une dernière hypothèse reste possible : une toxicité hépatique initiale.

La seconde idée a elle du attendre 1999 (26) pour que des chercheurs isolent pour la première fois le gène canin du facteur VIII et le placent dans un adénovirus. Son injection à des souris hémophiles a alors permis l'expression du gène à des taux dix fois supérieurs à ceux obtenus avec un même vecteur codant pour le facteur humain. Cette expression s'est maintenue à des taux bien supérieurs à ceux thérapeutiques pour l'homme (1000 mU/ml soit 100% des taux normaux!) pendant plus de un an. On note de plus qu'aucune toxicité n'a été relevée aux doses de vecteurs utilisées, et qu'aucun animal n'a développé d'anticorps.

Ces résultats positifs s'expliquent par différentes données et hypothèses (26) :

- ☆ le facteur VIII canin est beaucoup moins immunogène que la protéine humaine,
- ☆ son gène ne présente pas de séquences inhibant la transcription,
- ☆ l'activité spécifique du facteur VIII canin recombinant synthétisé (bien que n'ayant pu être comparé à celle du facteur canin puisqu'il n'en n'existe pas en solution purifiée), est probablement plus élevée que celle de la protéine humaine : les mêmes taux de facteur VIII auraient ainsi une activité procoagulante plus importante (les taux normaux mesurés en mU/ml sont d'ailleurs 5 à 10 fois plus élevés chez le chien que chez l'homme).

☆ La protéine humaine lorsqu'elle est synthétisée doit subir un repliage complexe et interagir avec des protéines chaperon dans le réticulum endoplasmique afin d'être secrétée, ce qui n'est pas forcément le cas de la protéine canine qui pourrait emprunter une autre voie.

Quoi qu'il en soit, ce résultat marque un étape importante et permet à l'avenir d'espérer une correction phénotypique prolongée cette fois-ci sur un modèle canin. A la vue des taux obtenus sur l'animal, l'application à l'homme devra cependant être prudente...on suppose en effet que des valeurs >150% de facteur VIII pourraient être thrombogènes.

2-2-2 vecteurs de 3^{ème} et 4^{ème} génération

La mise au point d'adénovirus de plus en plus délétés, aussi dénommés vecteurs de 3^{ème} et 4^{ème} générations a permis d'élargir la taille du transgène à intégrer. Profitant de cette opportunité certains chercheurs ont donc utilisé ces vecteurs en tant que médiateur du gène complet du facteur VIII, autorisant ainsi l'expression *in vivo* à partir non plus du gène BDD mais à partir du **gène complet ou gène FL (Full length)** et assurant de façon certaine l'identité de la protéine néosynthétisée avec le facteur humain (3, 11, 90).

Si l'expression de ce gène se révèle douteuse avec des vecteurs de 3^{ème} génération (correction phénotypique prouvée avec 100% des souris hémophiles traitées survivantes au tail clipping alors que les taux de facteurs circulants détectés sont inférieurs à 1% !!: (11)), elle est en revanche plus prometteuse avec les vecteurs de 4^{ème} génération aussi appelé "miniAd" ou "gutless" (élimination de toutes les séquences virales) (3, 90).

L'intérêt majeur de ces vecteurs miniAd ne réside pourtant pas dans cette capacité à transporter le gène FL (puisque bien d'autres expériences ont montré l'adéquation du gène BDD pour la synthèse d'une protéine fonctionnelle), mais plutôt dans les faits suivants (50) :

- Ces vecteurs présentent une faible toxicité hépatique : des doses de $3 \cdot 10^{11}$ vecteurs/souris ne se révèlent pas hépatotoxiques alors que les mêmes doses d'adénovirus de 2^{ème} ou 1^{ère} génération l'étaient. De même des doses de $5 \cdot 10^{11}$ adénovirus de troisième génération se sont montrées fortement hépatotoxiques, voir hématotoxiques (chute des plaquettes) chez 4 chiens hémophiles traités (27). Seuls les vecteurs de 4^{ème} génération sont donc pour l'instant hors de cause dans ce phénomène.
- Ils engendrent eux aussi une réponse humorale contre les protéines du vecteur, mais celle-ci n'affecte pas l'expression du transgène et de plus s'atténue systématiquement avec le temps pour se négativer.

Compte tenu des dernières expériences en cours, ce dernier point laisse supposer qu'à la seule condition de ne pas être administrés à un sujet synthétisant des anticorps contre le facteur VIII, ces vecteurs miniAd pourraient assurer une expression à long terme et à des taux humains physiologiques (une expression sur plus de 18 mois a été obtenue chez une souris hémophile (3)).

Concernant les résultats obtenus dans ces expériences :

- les hauts taux d'expression obtenus sont mis sur le compte du promoteur albumine humain (12,5 kb) et d'autres séquences, dont l'insertion dans le génome viral est rendue possible suite à la plus grande place disponible (suppression de tous les gènes viraux).
- la longue persistance du transgène est elle attribuée à la plus grande taille du vecteur et à la présence de larges bandes d'ADN humain insérées dans le génome. Ces deux facteurs contribueraient à la stabilisation de l'ADN adénoviral épisomal.

2-4 limites des adénovirus

Ces dernières années, une correction complète de l'hémophilie A au moyen des adénovirus a été réalisée chez la souris et chez le chien, et une expression prolongée du facteur VIII a été obtenue sur le rongeur. L'utilité clinique des adénovirus reste pourtant limitée par les faits suivants (13) (dont certains sont en voie de résolution) :

- l'expression ne pourra durer toute la vie : ceci s'explique par deux phénomènes biologiques : d'une part le vecteur reste sous forme épisomale (donc non intégré au chromosome) ; d'autre part, la réponse cytotoxique CTL dirigée contre les produits du vecteur accélère l'élimination des hépatocytes transfectés (85). De nouvelles études sont aujourd'hui en cours pour diminuer la réponse de l'hôte et si possible prolonger l'expression du transgène.
- la réponse anticorps contre la capsid virale empêche une réadministration ultérieure du virus. Ceci reste l'un des obstacles les plus problématiques. Des techniques d'immunosuppression pour empêcher la synthèse d'anticorps contre les protéines de la capsid virale ont cependant été couronnées de succès chez la souris.

3/ VIRUS ADENO-ASSOCIES

Reste donc les AAV, qui comme nous l'avons vu présentent les avantages suivants :

- ne pas être associés à des maladies humaines,
- avoir une immunogénicité minimisée : les cellules infectées par l'AAV n'expriment pas de nouveaux antigènes de surfaces, ces virus peuvent engendrer uniquement une réponse immune de type humorale,
- permettre une expression à long terme, de par leur intégration au chromosome hôte ou leur persistance sous forme de concatémères.

Bien que l'usage de ces virus se soit déjà montré très satisfaisant pour le facteur IX, leur emploi comme vecteur du facteur VIII semble poser un problème technique majeur (mais apparemment surmontable) (41) :

le génome de l'AAV fait seulement 4,6kb, ce qui est trop court pour espérer y intégrer l'ADN complet du gène du facteur VIII (7kb). L'intégration du gène tronqué délété du domaine B est elle aussi problématique. Les AAV supportent en effet très mal de voir leur génome agrandi : une taille supérieure à 115% (soit 5,1kb) de l'AAV initial entraîne une chute des titres importante et une diminution de l'expression du transgène. Or la taille du gène BDD est de 4,4 kb ce qui rend difficile la génération d'un AAV le codant, qui devrait de plus porter un promoteur, et contenir un minimum de séquences virales (queue poly A, séquences TR).

Les premiers vecteurs AAV porteurs du BDD ont en fait été synthétisés en 1999 (31) par une équipe ayant réussi à élargir les délétions du domaine B pour obtenir des gènes encore plus petits, de respectivement 4273 et 4405 paires de bases. Le plus grand des deux gènes s'est révélé le plus efficace, montrant *in vitro*, une fois introduit dans l'AAV, une meilleure stabilité ainsi qu'une sécrétion et une activité biologique plus importantes.

Les chercheurs se sont aussi efforcés de tester un promoteur de taille minimale (le pHU1-1)*. Ce promoteur s'est révélé moyennement actif, mais l'expérience présente l'intérêt de prouver, déjà *in vitro*, la possibilité du transfert du gène du facteur VIII par les AAV, l'efficacité de la synthèse et la sécrétion de la protéine hors des cellules testées, ouvrant ainsi la porte aux essais *in vivo*.

*promoteur nucléaire humain de 243 pb, présentant a priori l'intérêt d'être actif dans tous les types cellulaires et de persister sous cette forme active alors que les promoteurs d'origine virale seraient eux peu à peu inactivés.

Récemment (9, 2000) une équipe s'est ainsi lancée dans l'aventure, injectant par voie portale des AAV génétiquement modifiés à des souris de deux souches.

Si cette injection a donné des résultats médiocres chez les souris C57/Bl6 (apparition d'anticorps anti fVIII => facteur VIII détecté à l'état de trace, mais pendant plus de 11 mois, ce qui prouve la persistance du transgène), elle a en revanche permis de mesurer des taux équivalents à 27% des taux humains normaux chez les souris SCID (immunodéficientes) ce qui est prometteur pour l'avenir.

Cette première expérience *in vivo* prouve non seulement la faisabilité du transfert du gène *in vivo*, mais aussi la très faible toxicité hépatique des AAV (pas de toxicité observée à des doses toxiques avec les adénovirus), et leur tropisme hépatique qui fait que le vecteur injecté se retrouve localisé dans ce tissu à l'exclusion de tous les autres.

Les 2 tableaux qui suivent présentent un bilan des études présentées jusque là. Le tableau 11 met en avant les principaux problèmes rencontrés avec le facteur VIII et les résultats obtenus avec les différents types de vecteurs. Le tableau 12 présente l'avantage de regrouper sur une même page les 3 tableaux de synthèse présentés jusqu'ici (tableaux 7, 9 et 11) et de permettre leur comparaison, offrant ainsi une vision très globale des expériences virales que nous venons de développer.

Tableau 11 : bilan des études présentées dans le tableau 10.

	Problèmes rencontrés avec le fVIII	Résultats obtenus sur le fVIII
Rétrovirus	<p>Impossibilité d'obtenir à haute doses, des vecteurs assurant une synthèse efficace du fVIII</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ système MFG ⇒ pseudotypage par VSV ⇒ élimination des séquences d'ADN (fVIII) inhibitrices ⇒ addition d'introns (= épissage de certaines séquences virales) ⇒ suppression des marqueurs <p>voie IM et SC inefficaces (le facteur VIII ne rejoint pas la circulation sanguine)</p>	<p>4 essais présentés (1992-1999)</p> <p>environ 5% des taux normaux pendant quelques jours</p>
Adénovirus	<p>Réponse CTL et anticorps importante, hépatotoxicité</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ mini Ad ⇒ gène du fVIII canin ⇒ administration de doses plus faibles de vecteurs (efficacité conservée grâce à l'addition au transgène de certains introns et promoteurs) ⇒ voie IV et souris C57/B16 	<p>8 essais présentés (1996-2001)</p> <p>vecteurs de 1^{re}, 2nde et 3^{ième} générations : 100% des taux normaux mais expression généralement transitoire</p> <p>vecteurs de 4^{ème} génération : idem mais expression sur plusieurs mois (jusqu'à 18 mois)</p>
AAV	<p>Taille trop grande du gène du fVIII, même BDD</p> <p>Choix d'un promoteur/enhancer petit et efficace</p>	<p>1 essais présenté (2000)</p> <p>25% des taux normaux pendant plus de 1 an (souris SCID)</p>

	Avantages principaux	Inconvénients majeurs	Problèmes rencontrés avec le fIX	Problèmes rencontrés avec le fVIII	Résultats obtenus sur le fIX	Résultats obtenus sur le fVIII
Rétrovirus	Pouvoir infectieux +++ Intégration efficace au chromosome	N'infecte que les cellules en division rapide (donc hépatocytes et myocytes non envisageables) Risque d'insertion mutagène Produit à des titres relativement bas N'accepte pas de larges insertions dans son génome (max = 8kb)	Synthèse d'anticorps contre la protéine humaine (hfIX) ⇒ études sur des souris immunodéficientes ⇒ mise au point du gène codant pour le facteur canin inactivation des promoteurs viraux = usage de promoteurs cellulaires	Impossibilité d'obtenir à haute doses des vecteurs assurant une synthèse efficace du fVIII ⇒ système MFG ⇒ pseudotypage par VSV ⇒ élimination des séquences d'ADN (fVIII) inhibitrice ⇒ addition d'introns voie IM et SC inefficaces (le facteur VIII ne rejoint pas la circulation sanguine)	6 essais présentés assez efficace chez la souris, mauvais résultats sur le chien études sur les fibroblastes, myoblastes, keratinocytes...	4 essais présentés environ 5% des taux normaux pendant quelques jours
	Emploi <i>ex vivo</i> pour la transfection de cellules en division rapide (fibroblastes par exemple)					
Adénovirus	Infecte les cellules en division lente ou rapide Accepte de larges insertions dans son génome (max = 30kb) Production à hauts titres Tropisme hépatique	Pas d'intégration au chromosome Induction de réponses immunes importantes	Expression trop transitoire = problèmes de réponse immune ⇒ injection par voie IV à des souris C57/Bl6 ⇒ emploi du fIX canin ⇒ usage d'un promoteur adéquat ⇒ miniAd impossibilité de réadministrer le vecteur	Réponse CTL et Anticorps importante, hépatotoxicité : ⇒ mini Ad ⇒ gène du fVIII canin ⇒ administration de doses plus faibles de vecteurs ⇒ voie IV et souris C57/Bl6	4 essais présentés résultats variables chez la souris, expression haute mais transitoire chez le chien, taux facilement équivalent à 200% des taux normaux Etudes sur la voie IV : Tropisme hépatique	8 essais présentés vecteurs de 1 ^{re} , 2 nd e et 3 ^{ème} générations : 100% des taux normaux mais expression généralement transitoire vecteurs de 4 ^{ème} génération : idem mais expression sur plusieurs mois (jusqu'à 18 mois)
	Emploi <i>in vivo</i> pour la transfection de cellules en division lente (hépatocytes par exemple)					
AAV	Innocuité Infecte les cellules en division lente ou rapide Intégration au chromosome dans certaines cellules Pas de réponse CD8+	N'accepte pas de larges insertions dans son génome (max = 4.1kb) Réponse immune CD4+	Promoteur CMV inefficace sur le foie. ⇒ usage d'un promoteur adéquat Synthèse d'anticorps contre la protéine humaine: ⇒ souris C57/Bl6 pour les injections par voie IV ⇒ utilisation de souris immunodéficientes pour les injections par voie IM	Taille trop grande du gène du fVIII, même BDD Choix d'un promoteur/enhancer petit et efficace.	10 essais présentés Quelques % des taux normaux pendant plus de 1 an chez le chien et la souris. Etudes sur la voie IV et IM.	1 essais présenté 25% des taux normaux pendant plus de 1 an (souris SCID)
	Emploi <i>in vivo</i> pour la transfection de cellules en division lente (ou rapide), avec expression à long terme					

Tableau 12 : regroupement des tableaux 7, 9 et 11 : vue d'ensemble des expériences employant des vecteurs viraux.

-chapitre 3-

***méthodes utilisant
des vecteurs
non viraux
pour traiter
les hémophilies A et B***

1/ généralités

La majorité des approches de thérapie génique fait appel aux vecteurs viraux comme agents de transfection. Cette idée se base sur le fait que de nombreux virus ont, au cours de l'évolution, développé un outillage leur permettant de délivrer efficacement leur ADN aux cellules d'un autre organisme. En parallèle à cette évolution, notre organisme s'est doté d'une réponse immune destinée à combattre ces virus, réponse immune à laquelle se trouvent maintenant confrontés les essais de thérapie génique faisant usage de ce type de vecteur. Tenant compte de plus des nombreux obstacles présents sur cette voie de recherche (et des questions qu'elle soulève), une autre voie de développement de la thérapie génique s'est mise en place (avec toutefois une dizaine d'années de retard) : depuis 1995, on voit paraître des résultats d'expériences issus d'une thérapie génique d'un autre genre : la thérapie génique non virale.

En fait les premiers articles traitant de ce sujet datent de 1983 -injection d'ADN nu- , mais il a fallu compter une dizaine d'années de recherche pour que les principales difficultés soient surmontées, les nouvelles idées développées et qu'on puisse penser à adapter ces techniques à des gènes plus complexes comme ceux en cause dans l'hémophilie.

Ce type de thérapie génique regroupe un nombre varié de techniques, allant de l'injection d'ADN nu à l'injection d'ADN additionné de molécules lui facilitant la traversée des membranes cellulaires. A l'heure actuelle, trois pistes de recherche ont ainsi été ouvertes (20) :

- l'électro-impulsion qui permet à l'ADN de traverser les membranes cellulaires,
- l'usage de liposomes qui, par fusion avec les membranes cellulaires, transportent l'ADN correcteur jusque dans la cellule,
- le couplage de l'ADN à une molécule (polylysine) susceptible d'être reconnue par un récepteur cellulaire.

Ces méthodes, qui en sont malheureusement au tout début de leur développement, se voient en pratique limitées par la faible efficacité du transport d'ADN et l'insuffisance de l'expression protéique qui s'ensuit. Elles permettraient pourtant de résoudre les problèmes liés à la taille du transgène, à l'induction de réponse immune, à l'intégration mutagène au chromosome hôte, ainsi que ceux induits par la réponse inflammatoire associée aux injections virales et à la toxicité potentielle de certains vecteurs.

Ces techniques doivent maintenant prouver leur efficacité et leur intérêt face aux méthodes virales ; et, de même que les virus ont au cours des siècles développé une multitude de stratégies d'invasions, la thérapie génique non virale doit à son tour résoudre les mêmes problèmes et y apporter ses solutions propres. Elle doit donc (web5) :

- **Adopter un mode de compaction du génome** permettant l'intégration du gène dans une particule de petite taille. L'ADN est en effet une molécule polyanionique que rien ne prédispose à traverser une membrane cellulaire constituée d'une bicouche lipidique qui présente elle-même de nombreuses charges négatives. De plus, une molécule d'ADN de quelques dizaines de milliers de paires de bases -un petit gène- est d'une taille comparable à celle de la cellule, ce qui rend la pénétration de l'une dans l'autre problématique.

Les cellules et les virus ont résolu ce problème en compactant l'ADN très fortement grâce à des protéines riches en acides aminés chargés positivement (comme les histones).

La plupart des vecteurs de synthèse utilisés pour le transfert de gènes sont eux des lipides et des polymères de nature cationique qui, comme les histones, peuvent compacter l'ADN.

- **Doter ces particules d'une capacité de fixation à la surface d'une cellule cible.** Les divers mécanismes en place dans la cellule pour l'absorption d'éléments du milieu extérieur (endocytose..) peuvent ainsi être exploités pour pénétrer. Encore faut-il que les particules soient suffisamment petites pour pouvoir atteindre leur cible sans être arrêtées par les filtre naturels que sont les poumons et le foie (à moins que ceux-ci ne soient justement des tissus cibles).

- **Permettre aux éléments enfin délivrés dans la cellule cible d'échapper à la dégradation intracellulaire.** En effet, les molécules entrant dans une cellule par voie endosomale, sont normalement détruites par les lysosomes dans lesquels des enzymes lytiques assurent la digestion des déchets produits par la cellule. Il est bien entendu indispensable que les complexes transfectants puissent sortir de l'endosome avant d'être entraînés vers une dégradation certaine dans le lysosome.

Dans le cas des complexe cationiques (polylysines), ceci est rendu possible par l'emploi de polyéthylènimines qui captent les ions H⁺ présents à l'intérieur de l'endosome. Ceci provoque une entrée d'eau par osmose, le gonflement de l'endosome et sa rupture.

Dans le cas des lipides cationiques (liposomes), ceci est permis par leur association avec un lipide particulier (DOPE ou DiOleoylPhosphatidylEthanolamine) dont l'activité fusiogène se révèle en milieu légèrement acide (soit dans l'endosome) et entraîne ainsi la déstabilisation de la bicouche lipidique.

- **Emprunter les réseaux du trafic intracellulaire afin d'acheminer le transgène jusqu'aux sites adaptés à son expression (le noyau par exemple).**

L'ADN introduit dans les cellules en croissance pénètre dans le noyau au cours de la division cellulaire, lorsque l'enveloppe nucléaire est dissociée. Dans les cellules au repos -état dans lequel se trouvent la majorité des cellules de l'organisme- l'enveloppe nucléaire constitue une séparation et ne laisse passer, par diffusion, que les molécules de diamètre inférieur à 9nm. Les molécules plus grosses (jusqu'à 25nm) peuvent emprunter les pores nucléaires, mais il s'agit alors d'un transport actif qui nécessite la reconnaissance de signaux de localisation nucléaire (NLS). Deux solutions s'offrent donc aux chercheurs : synthétiser des particules de taille suffisamment petite (<9nm) ou leur greffer des séquences NLS.

Et après?

L'ADN peut être considéré comme une prodrogue. En effet, la livraison du gène à la cellule est une étape nécessaire mais non suffisante, puisque l'activité thérapeutique suppose son expression. Au delà de la vectorisation de l'ADN dans les cellules cibles, d'autres éléments se révèlent cruciaux, comme par exemple le maintien du gène thérapeutique dans les cellules et la régulation de son expression....

Mais revenons maintenant aux principales méthodes mises en places :

- l'électroporation,
- l'usage de liposomes,
- le couplage à des molécules cationiques ou polylysines.

2/ Electroporation (technique de perméabilisation membranaire)

Développée en vue d'une thérapie génique *ex vivo*, cette méthode est en fait la première à avoir donné lieu à un succès notable dans l'histoire de la thérapie non virale : mise au point par Transkaryotic Therapy Inc., elle permet d'intégrer le transgène choisi (en l'occurrence facteur VIII) à l'intérieur de fibroblastes sans usage d'aucun vecteur viral...

Le déroulement des opérations a lieu de la façon suivante (web7, 43, 82) :

Les fibroblastes visés sont isolés à partir d'une biopsie cutanée puis transfectés : l'ADN "nu" pénètre dans la cellule par électroporation, c'est à dire suite au passage d'un bref courant électrique dans les cellules en culture ; ce courant induit une formation temporaire de trous dans les membranes cellulaires et permet ainsi le passage du transgène.

Les fibroblastes sont ensuite cultivés puis sélectionnés selon des critères prenant en compte l'expression du transgène, la stabilité du chromosome et la toxicité potentielle après une injection péritonéale (essai sur des souris immunologiquement affaiblies).

Les cellules ainsi sélectionnées sont ensuite remises en culture et injectées au donneur par voie intrapéritonéale (toutes les cellules injectées dérivent d'un seul clone cellulaire). Elles vont alors s'implanter dans cette cavité et exprimer le gène thérapeutique.

Prenant la suite des résultats encourageants obtenus sur le modèle murin et sur un essai clinique de phase I utilisant cette méthode pour produire l'hormone de croissance, un essai clinique de phase I concernant l'hémophilie A a été initié par les chercheurs ; il emploie pour une thérapie *ex vivo* des fibroblastes ainsi modifiés (voir partie essai sur l'homme).

Très récemment enfin, une équipe a réussi à appliquer cette technique *in vivo* (24) : l'application du champ électrique (ici un voltage faible de 375 volts/cm associé à des pulsations longues : 25ms toutes les secondes) a lieu sur l'animal, juste après l'injection intramusculaire du plasmide (codant pour le facteur IX humain). Les modèles canins et murins ainsi traités ont montré des taux plasmatiques de facteur IX compris entre 1 et 2% qui, chez les souris immunodéficientes, se sont maintenus pendant plus de 3 mois. De façon intéressante, la ré-administration du même plasmide est possible dans les mêmes muscles ; elle est suivie d'une sécrétion identique de facteur, ce qui permettrait de traiter un animal sur plusieurs mois, voir plusieurs années... Cette technique qui demande encore à être développée présente toutefois un léger point négatif : des traumatismes musculaires ponctuels (perte de myocytes, infiltration de monocytes) se retrouvent aux sites d'applications des électrodes.

3/ Endocytose médiée par un récepteur (51, 75, 90) :

C'est une des deux techniques utilisant un agent moléculaire non viral pour vectoriser l'ADN. Dans cette approche, l'ADN se voit couplé à une molécule de ciblage capable de se lier à un récepteur cellulaire spécifique, et d'entraîner ainsi l'endocytose et donc le transfert de l'ADN dans les cellules.

Ce couplage se fait normalement par l'intermédiaire de molécules de polylysine, qui ont la capacité de former une liaison réversible avec l'ADN (ADN poly-anionique, polylysine polycationique) et une liaison covalente avec une autre protéine.

Ces protéines "autres" permettent de cibler le transfert du gène vers un type cellulaire particulier. Les hépatocytes par exemple présentent à leur surface un récepteur capable de capter les asialoglycoprotéines du sérum. Le couplage de l'ADN du transgène à une asialoglycoprotéine par l'intermédiaire d'un polycation comme la polylysine, peut donc permettre le ciblage du transfert d'ADN vers les hépatocytes.

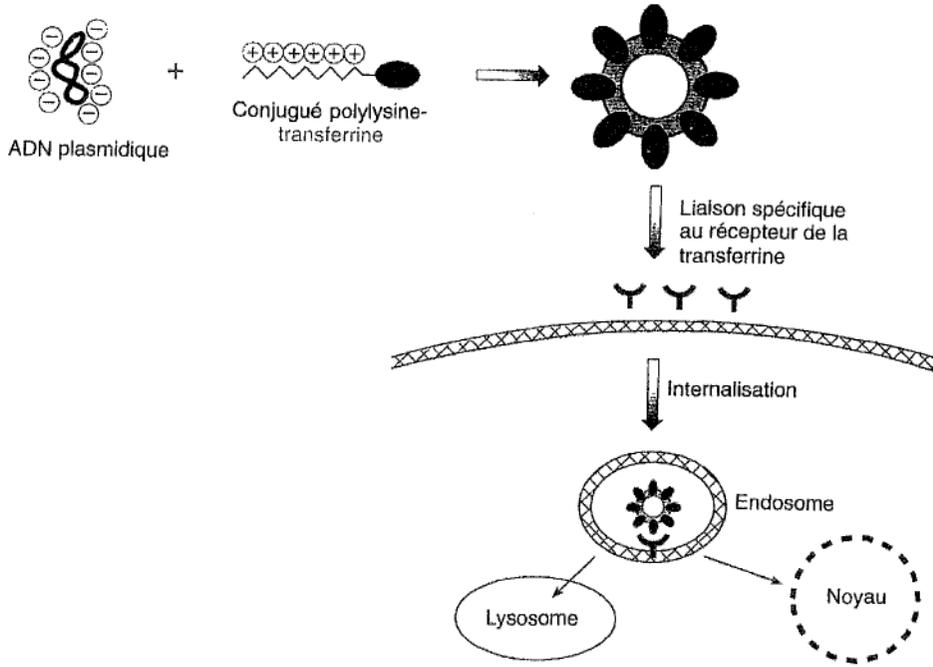
Une approche plus générale consiste à utiliser le récepteur de la transferrine qui est exprimé dans de nombreux types cellulaires, mais que l'on retrouve davantage dans les cellules proliférantes et hématopoïétiques (voir schéma page suivante).

Quoi qu'il en soit, et bien que l'efficacité du transfert de gène puisse se montrer élevée par cette méthode, le développement des polycations voit son intérêt limité par plusieurs problèmes :

- Les complexes protéines-ADN ne sont pas stables dans le sérum.
- Les conjugués ADN peuvent être empaquetés dans les endosomes et dégradés dans les lysosomes, à moins d'être co-transférés ou liés physiquement.
- La méthode ne permet pas l'intégration des gènes transférés. Ceux-ci vont donc présenter une durée d'expression réduite.

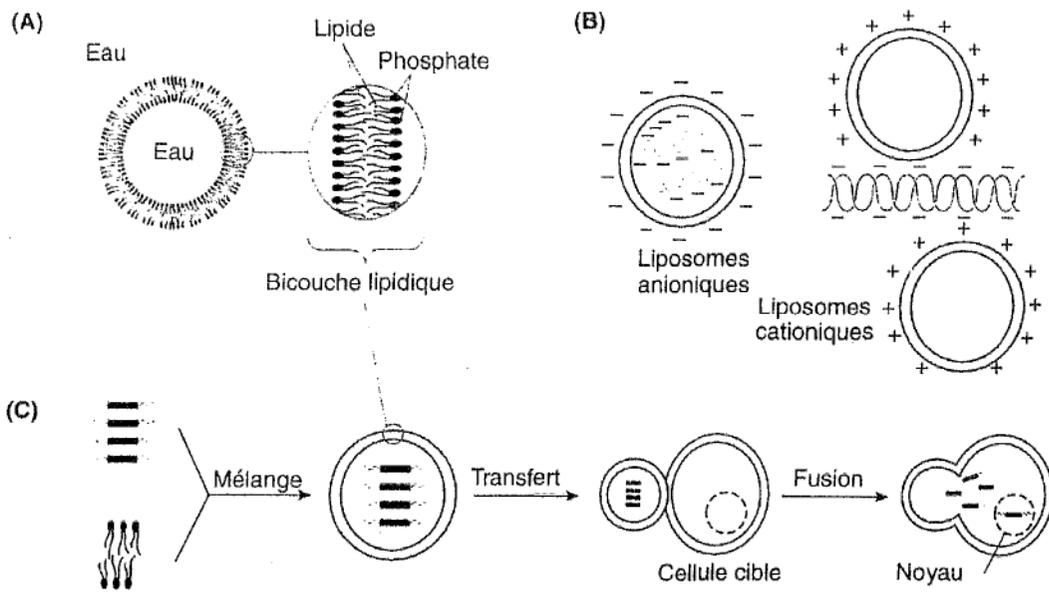
Fig 24. Strachan T, 1998. (75). Transfert de gène par endocytose médiée par un récepteur.

L'ADN plasmidique chargé négativement peut se lier réversiblement à une polylysine chargée positivement et attachée à une molécule de transferrine. Au cours de ce processus, L'ADN est condensé en une structure cellulaire compacte avec les molécules de transferrine localisées à l'extérieur et pouvant se lier au récepteur correspondant présent à la surface des cellules. Après formation d'un endosome, une partie des conjugués endocytés peut migrer vers le noyau (bien qu'une fraction significative soit transférée dans les lysosome et dégradée). L'efficacité du transfert peut être accrue par couplage à des molécules de polyéthylènes imines (voir texte).



4/ Liposomes (75, 90)

Les liposomes sont des vésicules sphériques composées d'une bicouche lipidique synthétique, qui mime la structure des membranes biologiques. Leur intérêt pour la thérapie génique réside dans leur capacité à emballer *in vitro* l'ADN. L'ADN à transférer peut ainsi être intégré dans la cavité liposomale puis réinjecté sous cette forme pour transfert *in vivo* dans le tissu cible ; l'enveloppe lipidique du liposome permettant à l'ADN de survivre *in vivo*, de se lier aux cellules et d'être endocyté.

Fig 25. StrachanT, 1998, (75) : apport de gène *in vivo* par les liposomes :

(A) et (B) : Structure des liposomes. Les liposomes sont des vésicules synthétiques qui peuvent se former spontanément en solution aqueuse après mélange des particules lipidiques. Dans certains cas, une bicouche lipidique se forme, dans laquelle les groupes phosphates se localisent au niveau des surfaces externes et les lipides hydrophiles au niveau interne. Les liposomes anioniques ont une charge de surface négative et, lorsque les constituants lipidiques se mélangent avec des molécules d'ADN chargées négativement, l'ADN est interné. Les liposomes cationiques ont une charge de surface positive, et les molécules d'ADN se lient à la surface des liposomes.

(C) Utilisation de liposomes pour le transfert de gène. La figure illustre l'utilisation de lipides anioniques. Les membranes plasmiques des cellules sont des structures fluides dont les principaux composants sont les phospholipides ; le mélange des cellules avec les liposomes peut entraîner la fusion entre la bicouche lipidique du liposome et la membrane plasmique. Le gène cloné peut alors être transféré dans le cytoplasme de la cellule et migrer dans le noyau par diffusion passive. Notons que, en pratique, les lipides cationiques sont les plus utilisés pour transférer l'ADN dans des cellules.

La première des expériences appliquée à l'hémophilie employant cette technique a été décrite en 1995 (5) : par injection IV de liposomes porteurs d'une charge électrique neutre et vectorisant un plasmide codant pour le facteur IX, les chercheurs ont obtenu une expression brève (7 jours) et faible (pic à 490ng/ml, diminuant rapidement). Cette expérience prouve le transfert du transgène aux cellules hôtes, la synthèse de la protéine correspondante, son passage dans la circulation systémique et l'activité de cette protéine. Elle pose aussi le

problème de la dégradation lysosomale, qui semble être un facteur limitant important et le résout en partie en prétraitant les souris cobayes par de la colchicine et de la chloroquine (ces molécules inhibent l'acidité et la fonctionnalité des lysosomes). D'autres chercheurs utilisent dans le même but des phosphatidyl-éthanolamines intégrés dans la bicouche lipidique liposomale.

L'efficacité du transfert semble, elle, être accrue (90) par l'utilisation de liposomes intégrant dans leur membrane des molécules de cholestérol, ou des protéines fibreuses d'adénovirus (ces protéines jouent un rôle dans l'adhésion de tels virus aux cellules hôtes).

Du fait des problèmes de sécurité posés par les virus recombinants, les liposomes ont suscité beaucoup d'intérêt en tant que véhicules de transfert :

- méthode d'encapsulation facile, efficace et reproductible,
- vecteurs non immunogènes,
- capables de contenir des ADN de grande taille,
- et de co-encapsuler avec cet ADN des molécules perturbant l'action des lysosomes, ou des molécules facilitant le transfert de l'ADN jusqu'au noyau...
- Pouvant contenir dans leurs membranes des protéines ou des agents spécifiques d'un récepteur cellulaire : on peut ainsi cibler un organe précis.

Ces intérêts ont pourtant été rapidement contrebalancés par la faible efficacité de transfert de gène et la non intégration du transgène à l'ADN chromosomique (induisant une expression transitoire).

Curieusement ce dernier point, à savoir la faible intégration aux chromosomes des ADN vectorisés par les 3 techniques, a eu pour résultat d'orienter les études vers un nouveau type de thérapie génique, totalement différent et plus adapté à ces méthodes, au principe intéressant mais aussi porteur de nombreuses limites et de nouvelles complications : la thérapie génique correctrice.

5/ Thérapie génique correctrice

Le principe est simple, il ne s'agit plus cette fois d'apporter à la cellule un ADN supplémentaire sensé synthétiser une protéine normale à la place de l'ADN original, mais de corriger cet ADN original lui même pour qu'il synthétise la protéine : il n'est donc plus question d'intégrer l'ADN vectorisé au chromosome, mais simplement de lui permettre d'atteindre le noyau cellulaire pour qu'au contact de l'ADN nucléaire il transmette sa correction...

Liposomes et polycations sont particulièrement utilisés dans ce domaine. Les oligonucléotides transportés peuvent alors migrer rapidement vers le noyau (diffusion passive à travers l'enveloppe nucléaire). A l'intérieur des cellules, les oligonucléotides sont alors exposés à l'attaque par les nucléases, notamment les exonucléases, et leur demi-vie est d'environ 20 minutes (pour des oligonucléotides conventionnels). Il est donc habituel d'en modifier chimiquement les extrémités 3' et 5' afin de les protéger de ces attaques.

L'ADN simple vectorisé se révèle malheureusement un mauvais outil, ne permettant ni une haute fréquence de conversion, ni une correction spécifique de site. Deux autres stratégies ont donc été développées :

- l'usage de monomères d'ADN capables de se lier à l'ADN cellulaire, transformant momentanément cette double hélice naturelle en une triple hélice,
- l'usage de chimères ADN/ARN.

Si toutes deux sont intéressantes, elles demeurent cependant applicables uniquement aux maladies dont la mutation responsable toucherait une seule base d'ADN, ce qui concerne donc une grande partie des hémophilies B, certaines hémophilies A, mais aussi d'autres pathologies telles que la maladie de Von Willebrand, celle de la résistance à la protéine C activée, l'albinisme, l'immunodéficience sévère combinée, la mucoviscidose...

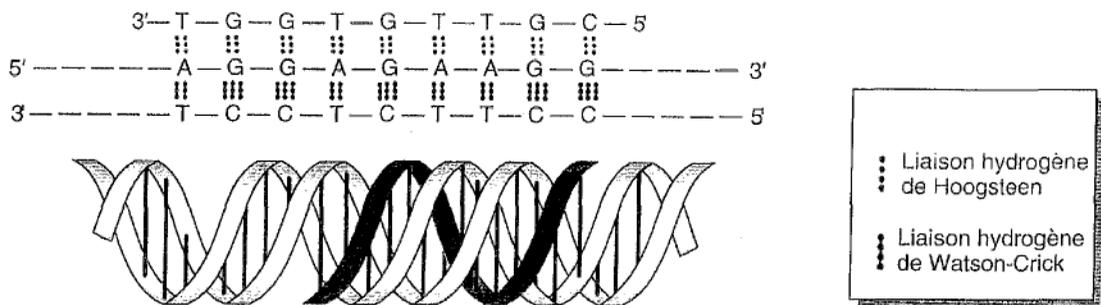
5-1 usage de monomères d'ADN de type homopurine ou homopyrimidine (6, 75)

Il s'agit de la première des techniques développées : cette thérapeutique repose sur la capacité de liaison des oligonucléotides au sillon majeur de la double hélice : de courts oligonucléotides synthétiques (15 à 27 nucléotides) sont en effet capables de se lier spécifiquement à une séquence de l'ADN double brin, formant une triple hélice.

Les chercheurs ont en fait montré qu'un ADN monocaténaire composé de bases pyrimidiniques pouvait se lier spécifiquement à une région d'ADN bicaténaire homologue composée de bases purines en se fixant sur le brin opposé (fixation orientée dans le même sens que le brin de purines) via des liaisons hydrogènes dites de Hoogsteen, et ce sans interrompre les liaisons hydrogènes de Watson-Crick originelles. Les bases thymines (T) du brin monocaténaire se lient spécifiquement aux couples adénines-thymines (AT) de la double hélice pour former des triplet (T.AT), tandis que les bases cytosines (C) se lient

spécifiquement aux couples guanine-cytosine pour former des triplets (C.GC), appariement assurant la plus grande stabilité des liaisons de Hoogsteen.

Figure 26. Strachan T, 1998 (75) : formation d'une triple hélice stable : la liaison hydrogène de Hoogsteen est possible au niveau de toutes les positions des bases. Cela signifie que la séquence de reconnaissance homologe dans l'ADN double brin est assez inhabituelle : le brin auquel se lie l'oligonucléotide ne contient que des purines. Il se lie au grand sillon.



Si cette technique permet effectivement la correction des bases mutées suite à l'alignement des trois brins, elle voit son intérêt limité par le fait qu'elle ne peut être appliquée qu'à des maladies causées par une mutation touchant uniquement des séquences de type homopurine ou homopyridine.

Ce problème est résolu si au lieu d'employer comme agent un monobrin d'ADN on utilise une chimère double brin :

5-2 usage de chimère (51, 87, 90)

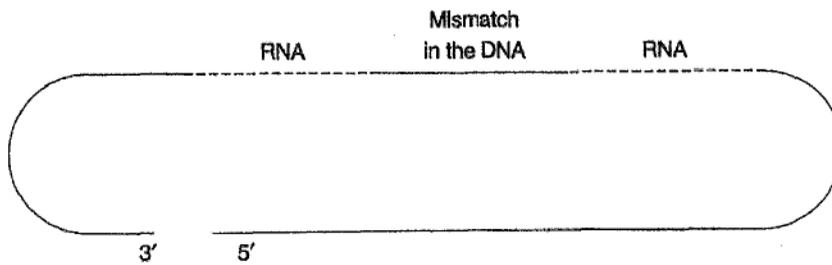
Il s'agit cette fois-ci d'employer des molécules bicaténares formées d'un mélange d'ADN et d'ARN (la technique se base sur l'observation *in vitro* que les molécules hybrides ARN/ADN peuvent former des paires homologues).

Les molécules d'ARN/ADN utilisées dans les expériences de ce type sont des molécules complémentaires du gène ciblé, excepté par un nucléotide qui diffère dans la partie ADN.

C'est ce nucléotide différent, qui, reconnu par le système réparateur de l'ADN, va induire la correction de la séquence génomique ciblée, mettant en œuvre un mécanisme endogène encore mal connu qui semble être présent dans un certain nombre de cellules, qu'elles soient en division active ou quiescentes.

Ces chimères ADN/ARN sont toutes construites selon le même modèle ayant pour centre le nucléotide "correcteur" : un brin ARN-ADN-ARN auquel fait face un brin d'ADN complémentaire.

Fig 27. Zhang Z, 1997, (90) : structure d'une chimère ADN/ARN



Elles contiennent 5 bases d'ADN (dont une centrale correspondant au nucléotide correcteur et entourée par les deux nucléotides de son codon), entourées à leurs extrémités par 10 bases d'ARN orthométhylées, suivies d'une boucle en épingle à cheveux de type poly T et flanquées de résidus GC (51). L'ensemble ADN/ARN assurerait ainsi une correction optimale de la mutation, les résidus poly T et GC permettraient la stabilité de la molécule et sa résistance aux nucléases et hélicases, la méthylation des bases ribonucléiques apporterait une protection face aux ARNases des cellules de mammifères.

Ces chimères ont la capacité de former un hybride avec la séquence cible homologue : il y a ainsi formation d'un trimère si la séquence cible est sous forme simple brin (soit pendant les périodes de réplication et de transcription), ou d'un tétramère si elle se présente sous forme double brin (90).

Figure 28. D'après Kren BT, 1998 (51) : Appariement des chimères à l'ADN homologue.

Les bases d'ADN sont symbolisées par la lettre "D", celles d'ARN par la lettre "R", les lettres "T" indiquent les séquences riches en résidus thymine.



Cette étape d'appariement semble être le processus limitant et apparaît facilitée par la nature mixte ARN/ADN de la chimère (qui pourrait être reconnue par la cellule comme un brin en cours de transcription). Par la suite, la distorsion de structure causée par le nucléotide différent est reconnue par un système de réparation endogène et induit un changement de la séquence cible ou de la séquence chimère probablement par un mécanisme de recombinaison homologue (les éléments en faveur de cette hypothèse étant la faible durée du mécanisme mis

en jeu : moins de 24 heures, et la spécificité de la correction effectuée qui traduit un mécanisme non aléatoire plutôt qu'une insertion au hasard (51)).

La correction de la mutation semble se faire à un taux suffisant pour qu'on puisse ainsi espérer rétablir ou corriger une fonction organique ou cellulaire ; elle semble de plus être dose-dépendante, spécifique du site visé, et indépendante de l'état de transcription de la cellule (90). Les hépatocytes (cellules en division lente) sont par exemple dotés de ce mécanisme, et ce avec une efficacité suffisamment importante pour qu'on puisse les envisager comme tissu cible dans ce type d'approche. La méthode s'est ainsi révélée efficace sur les cellules CHO (51), les lymphoblastes (51) et les hépatocytes (87). La correction de la mutation, prouvée *in vitro*, se retrouve *in vivo* et le gène modifié est effectivement transcrit induisant une modification de la synthèse protéique.

Cette méthode a pour l'instant été appliquée à un nombre restreint de gènes, à savoir ceux impliqués dans la synthèse des phosphatases alcalines, la drépanocytose, l'hyperbilirubinémie, l'albinisme et l'hémophilie B.

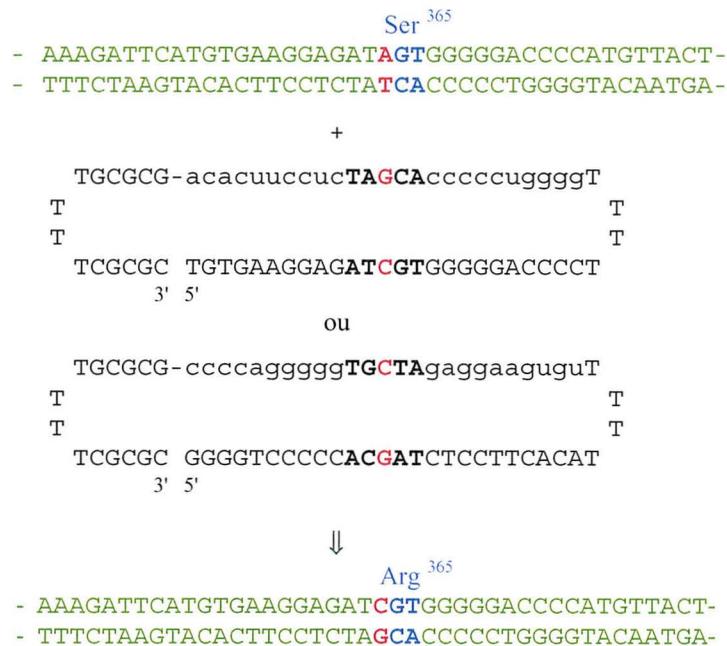
L'expérience à laquelle nous allons nous intéresser maintenant, a eu pour objectif un peu original, d'induire sur le gène normal du facteur IX, une mutation responsable de l'hémophilie B (51).

Le principe se révélant efficace *in vitro*, l'essai *in vivo* sur des souris a été tenté. Pour ce faire, l'équipe a utilisé la voie intraveineuse afin d'apporter aux hépatocytes la mutation voulue, à savoir remplacement de la serine³⁶⁵ du site actif du facteur IX par une arginine, ce qui devrait se traduire en pratique par une conversion d'un phénotype normal en un phénotype hémophile.

Fig 29. d'après Kren BT, 1998, (51) :

La séquence homologue du gène du facteur IX (en vert) s'aligne avec la séquence chimère correspondante (en noir).

Le codon Ser 365 est marqué en bleu, et le nucléotide cible en rouge. Les bases d'ARN orthométhylées sont notées en minuscules et les bases d'ADN en majuscules, avec au centre le nucléotide à corriger. Le resserrement G:C est identifié par une coupure artificielle 3' 5' dans le brin complémentaire. Des hépatocytes de rats transfectés *in vitro* par une telle chimère portant une seule mutation correspondant à la Ser 365 de la région codante du facteur IX de rat, voient leur résidu adénine convertit en résidu cytosine.



Dans le but de favoriser leur captation hépatique les oligonucléotides injectés ont été auparavant complexés avec des polyéthylène-imines lactées (PEI) (particules lactées connues pour leur affinité avec les récepteurs hépatiques aux asialoglycoprotéines).

Une fois internés dans la cellule, ces complexes entrent par voie endosomale dans le noyau.

Sous ces conditions, et sans hépatectomie partielle, une double injection IV a permis la conversion de 40% des sites Ser³⁶⁵ en Arg. Bien que ce résultat n'ait pas été confirmé par une analyse Western Blot, les souris ont montré une diminution de 50% de leur activité anticoagulante du facteur IX et une prolongation de leur aPTT de l'ordre de 25%, ceci pendant une période de plus de 1 an, ce qui prouve l'efficacité de la méthode.

Des études plus récentes montrent qu'une hépatectomie partielle (70% du foie enlevé), permet la régénération des hépatocytes avec conservation de la mutation apportée. Cette approche a été utilisée pour corriger l'hyperbilirubinémie chez le rat ; la correction du nucléotide ciblé a alors été obtenue dans 15 à 20% des hépatocytes et a permis de diminuer les taux de bilirubine de 60%. Elle a aussi été employée avec succès pour corriger l'albinisme (résultant de la mutation d'une seule base) de rat.(43)

Cette technique d'hépatectomie serait toutefois trop invalidante chez l'homme et reste pour l'instant uniquement une expérience de laboratoire. L'approche simple sans hépatectomie serait elle plus intéressante, mais malgré des premiers résultats encourageants, le scepticisme règne actuellement concernant la reproductibilité des résultats, les méthodes d'obtention de chimères de haute pureté et les conditions concernant l'apport à haut titre de ces chimères au niveau nucléaire.(43)

Si les résultats continuent toutefois à se montrer encourageants, la méthode pourrait être appliquée à la mucoviscidose, certaines hémophilies... Et pourquoi pas déboucher sur des essais cliniques. Limitée toutefois aux mutations ponctuelles son champ d'application futur semble se rétrécir encore plus : de par leur position dans le nucléosome certains gènes seraient inaccessibles aux chimères oligonucléotidiques... pour eux, seules les méthodes virales ou l'électroporation resteraient donc envisageables.

PARTIE 4

application à l'homme

1. Essais cliniques : le choix des patients

De nombreux risques potentiels, connus ou non, demeurent encore associés à la thérapie génique. Ces risques varient selon le type de vecteur utilisé, la voie de délivrance, et le type de cellule hôte. Ils incluent le risque de développement d'anticorps inhibiteurs, la transmission aux cellules germinales, l'induction de cancers (insertions mutagènes), l'apparition d'une réponse immune contre le vecteur viral (empêchant l'efficacité d'une réadministration du vecteur)... (59)

Pourtant les essais cliniques débutent aux USA sur des patients hémophiles. Ils débutent, et pour cela, à cause de cela, les scientifiques impliqués, la FDA (United States Food and Drug Administration), et peut être plus encore les membres de la communauté hémophile se doivent de décider quelles catégories d'individus affectés entreront dans ces essais, particulièrement dans les premiers essais de phase I.

Il leur appartient donc de répondre à certaines questions : Quels doivent être les premiers patients enrôlés dans chaque essai? Qui tirera le plus de bénéfices si la thérapie génique prouve son efficacité et sa sûreté? Quels sont les sujets les plus à risques si un problème inattendu surgit? Quels résultats doit-on considérer comme satisfaisants? Il est clair que certaines questions sont plus difficiles que d'autres, en voici un tour d'horizon...

Qui bénéficierait le plus d'une thérapie génique ?

Ce sont clairement les patients atteints d'hémophilie A et B sévères, chez lesquels le niveau basal de facteur VIII ou IX est inférieur à 1%. Ces personnes ont en effet des risques beaucoup plus importants de saignements spontanés et traumatiques, particulièrement dans les tissus mous et les articulations. Cette observation est d'ailleurs à la base des traitements prophylactiques : en Suède par exemple les enfants atteints d'hémophilie sévère sont mis sous traitement prophylactique dès l'âge de 1 ou 2 ans (57, 59). Des doses de 25 à 40 IU/Kg leur sont injectées un jour sur deux (pour le facteur VIII) ou trois fois par semaine (pour le facteur IX qui a une demi-vie plus longue), ceci dans le but de maintenir dans leur sang des taux de facteur supérieurs à 1%. Les résultats sont nets : la plupart des adolescents et des jeunes adultes ainsi traités ont des épisodes de saignements très rares et gardent une excellente structure et fonctionnalité de leurs articulations. Il apparaît donc que des très faibles taux de facteurs circulants peuvent faire une très grande différence dans la pathologie clinique .

Ainsi si l'une des approches de thérapie génique permettait aux hémophiles sévères d'avoir un taux de base de l'ordre de 2 à 5%, ceux-ci seraient alors atteints d'une forme modérée ne requérant une thérapie que lors des épisodes traumatiques. Leurs conditions de vie seraient encore considérablement améliorées si des taux supérieurs à 5% pouvaient être atteints et maintenus, leur permettant ainsi d'entrer dans la catégorie des hémophilies mineures, avec peu d'épisodes de saignements. Si ces taux pouvaient de plus être maintenus entre 20 et 30% des taux plasmatiques normaux, alors ces individus mèneraient une vie normale, avec des épisodes de saignement survenant seulement lors des traumatismes majeurs. Ils seraient donc protégés des risques de saignements mortels et des pathologies articulaires chroniques.

Quel type de sujet entrera dans les premiers essais cliniques?

Il s'agit ici de définir les caractéristiques individuelles importantes autorisant le recrutement d'un patient en vue d'essais cliniques.

● Nous avons déjà parlé du "degré" de l'hémophilie : les sujets atteints d'une hémophilie sévère seront choisis prioritairement.

● L'âge est aussi un critère à prendre en compte : les patients susceptibles de participer aux essais cliniques devront être adultes (protection des enfants).

Rappelons en effet que de nos jours le traitement de l'hémophilie par les méthodes classiques est très satisfaisant, que malgré le désagrément du au besoin fréquent d'injections intraveineuses, les concentrés de facteurs employés sont aujourd'hui bien plus sûrs qu'avant et que la plupart des enfants nouvellement diagnostiqués dans les pays développés peuvent mener une vie presque normale. Il serait donc dommage et inutile d'envisager de traiter ces enfants par thérapie génique avant que la méthode n'ait prouvé son efficacité et sa sûreté chez l'adulte.

● Dans le but de limiter le développement d'une réponse immune, un autre critère d'admission à valider sera :

- D'une part, un traitement antérieur lourd du patient (de l'ordre de 150 jours d'expositions aux facteurs VIII ou IX) et ce sans développement passé ou présent d'anticorps contre le facteur injecté.
- D'autre part, la connaissance documentée de la cause de la déficience du gène : une mutation associée à une absence totale de facteur (Cf. larges délétions du gène), et donc un risque plus grand de formation d'inhibiteurs peut par exemple être un critère d'exclusion du patient.

● En ce qui concerne les patients touchés par le virus du sida ou de l'hépatite C (HCV), le choix est discutable :

Un individu VIH + et sévèrement immunodéficient ne serait pas un bon candidat puisque sa capacité de synthèse d'anticorps inhibiteurs risque d'être abolie. Cela risquerait donc de donner un faux sentiment de sûreté concernant l'immunogénicité du vecteur. De plus la durée de vie de ces patients pourrait être trop courte pour permettre leur recensement dans une banque de données sur les effets à long terme de la thérapie génique. Un adulte infecté par le VIH mais présentant un taux de CD4 supérieur à 300 pourrait par contre être un candidat idéal.

Les sujets infectés et par le VIH et par le HCV, et qui développent en général plus rapidement des affections du foie (résultant notamment d'une production de cytokines et lymphokines), seraient pour l'instant à exclure dans la mesure où nous ne savons pas si les vecteurs viraux sont susceptibles d'induire ce genre de réponse et donc d'accroître la progression de maladies hépatiques.

Les infections secondaires, les maladies inflammatoires et les médicaments employés dans le traitement de ces maladies pourraient de plus favoriser la formation d'inhibiteurs. De même l'utilisation d'antiviraux (inhibiteurs de la reverse transcriptase, anti-protéases, ribavarine et l'interféron α) pourraient perturber la transfection du gène et empêcher l'emploi de certains vecteurs (rétrovirus chez un sidéen traité). Enfin l'impact d'une maladie hépatique sur la transduction des hépatocytes par un vecteur viral est inconnu.

● Reste la question de la descendance : les premières études employant certains types de vecteurs devraient-elles être réduites aux hommes incapables ou ayant très peu de chance d'avoir des enfants?

Une faible possibilité existe effectivement pour qu'une transmission aux cellules germinales puisse avoir lieu. Ceci pourrait induire des malformations fœtales ou le développement de processus malins. Ce risque, qui ne concerne pas toutes les formes de thérapie génique, serait (au moins en théorie) possible avec les rétrovirus : les études sur l'animal ont démontré que de petites quantités de génome viral se retrouvaient dans divers organes et tissus. Il semblerait donc sage de procéder avec prudence jusqu'à ce que des résultats portant sur de larges études sur les petits animaux soient connus.

En fin de compte quels critères de sélection seront donc retenus?

Le paradigme établi par White et ses collaborateurs, concernant les essais cliniques des nouveaux traitements anti-hémophiliques, suppose que la première cohorte de patients devrait être composée de sujets de préférence adultes, compromis par une affection virale, ayant déjà subi de nombreuses injections de facteurs recombinants ou de plasma, n'ayant jamais développé d'inhibiteurs, et dont la mutation génétique identifiée serait impropre à favoriser leur apparition. Ceci n'est pas toujours respecté (voir partie "toxicité à court terme").

Comment doivent être surveillés les sujets soumis à une thérapie génique?

La surveillance devra porter sur :

- l'efficacité,
- la toxicité à court terme et à long terme,
- l'immunogénicité.

L'efficacité sera évaluée par une mesure régulière des taux de facteur VIII et IX (tests de coagulation). S'ils sont en trop faibles quantités pour être détectés par les méthodes standard, les méthodes ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pourront être employées (détection de taux de facteur VIII compris entre 1 et 20 ng/ml). Le nombre et l'importance des épisodes infectieux devront être soigneusement enregistrés, de même que l'emploi éventuel de facteur de coagulation.

La formation d'inhibiteurs pourra être suivie par des méthodes standard de dosage, de très faibles taux pouvant être mesurés par les techniques ELISA ou par une modification des méthodes Bethesda.

Les preuves d'une hépatotoxicité (enzymes) ou d'une atteinte des autres organes seront recherchées sur le long terme, de même qu'une augmentation du nombre d'infections, l'apparition d'évènements non prévus...

Quels résultats doit-on considérer comme acceptables?

Le traitement idéal devrait être efficace, sur le long terme, peu invasif et sûr.

Comme il a été noté au début de ce chapitre, l'obtention et le maintien de taux de facteur situés entre 2 à 5% résulteraient en une hémophilie modérée, alors que des taux supérieurs à 5% amélioreraient de façon importante la qualité de vie des sujets et que des taux de 20 à 30% leur permettraient une vie quasiment normale. L'obtention de taux proches de 100% bien qu'à priori sans risque semble toutefois hasardeuse.

En ce qui concerne l'effet à long terme, l'idéal serait une expression de plus de 1 an. Cependant, certains patients considèrent que si le traitement pouvait être réadministré avec succès et que les épisodes de saignement diminuaient de façon très importante, ils accepteraient de subir une injection tous les 3 à 6 mois.

La méthode devra être sûre, si possible pour tout sujet éventuel, au moins pour les catégories de patients chez qui elle sera utilisée et à qui elle devra assurer une certaine qualité de vie : ceux-ci ne devront pas se retrouver dans un état plus précaire que celui qu'ils avaient lors d'un traitement par concentrés de facteurs.

Enfin pour être considérée comme acceptable, la thérapie génique devra être la moins invasive possible, à savoir idéalement une ou quelques injections IV (ou IM ou SC) regroupées sur une courte période. Des procédures chirurgicales répétées, des greffes de tissus, ponctions de moelle osseuse ou biopsies seraient quant à elles moins bien acceptées.

Sécurité à long terme?

On considère jusqu'à présent comme peu probable que la prolifération du vecteur ou sa destruction puisse être contrôlée par le vecteur lui-même. Cependant, en même temps que les expériences cliniques de thérapie génique se multiplient, plus d'études et d'informations sur les possibilités d'insertion mutagène du transgène (...) sont attendues.

Pour l'instant on dénombre près de 40 personnes "survivant au long terme" d'une thérapie génique :

- Les premiers protocoles de thérapie génique ont été initiés en 1990, sur deux patients atteints d'immunodéficience sévère combinée. Le traitement a impliqué l'infection *ex vivo* de lymphocytes CD34+ autologues par des rétrovirus porteurs du gène adénosine déaminase.
- A suivi ensuite le traitement de 5 patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (transduction *ex vivo* d'hépatocytes autologues),
- Et celui d' environ 30 jeunes adultes atteints de mucoviscidose (transduction *in vivo* de cellules épithéliales du tractus respiratoire via un AAV).

Parmi elles, il n'y a apparemment eu aucun développement de tumeur, aucune émergence d'un clone cellulaire ; parmi les 5000 sujets jusqu'à présent traités par thérapie génique non plus. Ainsi, bien que le recul soit encore insuffisant concernant la sécurité au long terme des sujets traités par thérapie génique, les premiers résultats sont positifs et encourageants.

L'autre point fort discuté concerne la possibilité de transmission du transgène aux cellules germinales. Pour l'instant, dans le but d'étudier cette transmission, une étude relativement importante a été menée (1998), injectant par voie IV un vecteur adénoviral à une soixantaine de souris. La transmission du transgène sur la génération suivante a été suivie : parmi les 800 descendants, la recherche de séquences virales effectuée a été systématiquement négative, sans preuve donc de transmission germinale.

Des études similaires et plus étendues restent cependant à réaliser avec d'autres vecteurs et d'autres espèces animales pour pouvoir répondre de façon sûre à cette problématique.

Et à court terme :

Et si le pire arrivait : malgré ses espoirs prometteurs, la thérapie génique reste une procédure expérimentale, avec ses risques, ses dangers et parmi eux celui que l'on n'avait jamais vraiment envisagé : en septembre 2000, un jeune garçon de 18 ans, Jesse Gelsinger (Arizona) est décédé des suites de sa thérapie génique (web5).

Plutôt costaud, en bonne santé grâce à un traitement médicamenteux et à un régime efficace, Jesse souffrait d'un déficit en OTC (Ornithine TransCarbamylyase). Traité par injection (voie IV) d'adénovirus génétiquement modifiés pour combler ce déficit, Jesse a, dans les 24 heures suivantes, commencé à souffrir de troubles de la coagulation, puis de défaillance respiratoire et finalement d'une atteinte hépatique et rénale. Il est mort en moins de 4 jours, apparemment des suites d'une réaction immune intense, jamais observée auparavant.

Quelle(s) leçon(s) devons nous en tirer?, que faire pour limiter les risques, puisque risque il y a?

Peut être tout simplement :

- 1/ admettre ce risque, ne pas s'engager dans les essais pour être le premier "chez qui ça marche", ne pas y engager des enfants, des adolescents (comme c'est encore le cas dans certaines études), mais plutôt des sujets à espérance de vie limitée.
- 2/ vérifier l'efficacité et la sûreté de la méthode sur des modèles animaux. Ils ne sont peut être pas comparables à l'homme en terme de réaction immune ... mais c'est là le seul moyen à notre disposition. Certaines études ont pourtant été commencées sans ces résultats préalables (et même s'ils sont aujourd'hui publiés, n'auraient-on pas du les réaliser avant ?)

2 UNE THERAPEUTIQUE POUR QUAND ?

2.1/ présentation des essais en cours

En 1998, les premières demandes d'autorisation à procéder à des études cliniques de phase I sur l'homme ont été adressées à la Food and Drug Administration. Ces études de phases I ont pour objet l'évaluation de l'innocuité d'une méthode thérapeutique chez un nombre restreint de patient et ne sont pas spécialement conçues pour en vérifier l'efficacité.

Quatre essais sont actuellement en cours, trois autres demandes (pour l'instant stade préclinique) sont actuellement étudiées et les premiers résultats sont encourageants : les chercheurs affirment que certains patients ont vu leur capacité de coagulation augmenter (nombre de saignements réduits), et que chez tous les sujets enrôlés, aucun effet secondaire significatif n'est apparu ; pas de formation d'inhibiteur non plus, une procédure bien supportée, des suites sans problèmes...

Tableau 13 : Etudes au stade préclinique (web7) :

Groupe	vecteurs	Autres renseignements
Novartis AG	Adénovirus	Bons résultats chez la souris, très faible réponse immune Mais toxicité hépatique chez le chien
Cell Genesys Inc	AAV	
Kimeragen Inc	Chimères d'oligonucléotides	

Tableau 14 : Essai de phase I (web6, web7, 81) :

Groupe	Transkaryotic Therapies Inc. (TKT)	Chiron Corp.	Avigen Inc.
patients	Hémophilie A 6 patients traités 12 patients initialement prévus	Hémophilie A 10 patients enrôlés 9 patients initialement prévus	Hémophilie B 8 patients enrôlés 9 patients initialement prévus
Etude	Début en décembre 1998 suivi sur 2 ans	Début le 1 ^{er} Juin 1999 suivi sur 1 an	Début en Juin 1999 Suivi sur 9 mois
principe	Etude <i>ex vivo</i> non virale "Escalation dose study"	Etude <i>in vivo</i> "Escalation dose study" 5 doses de vecteurs	Etude <i>in vivo</i> "Escalation dose study" 3 doses de vecteurs
vecteurs	Electroporation h f VIII BDD promoteur CMV	Rétrovirus (MoMLV) h f VIII BDD	AAV h f IX promoteur CMV
méthode	Prélèvement de fibroblastes cutanés sur un patient (biopsie), introduction du transgène par impulsion électrique, sélection d'une cellule transfectée et mise en culture, puis introduction dans la cavité péritonéale du patient	Voie IV périphérique, injection unique	Injection unique IM

* Un quatrième essai a été approuvé en mars 2000. Mené par Gen Star Therapeutics il emploie un vecteur adénoviral de 4^{ème} génération ou miniAd pour traiter l'hémophilie B (29).

2.2/ essai clinique de phase I employant les AAV

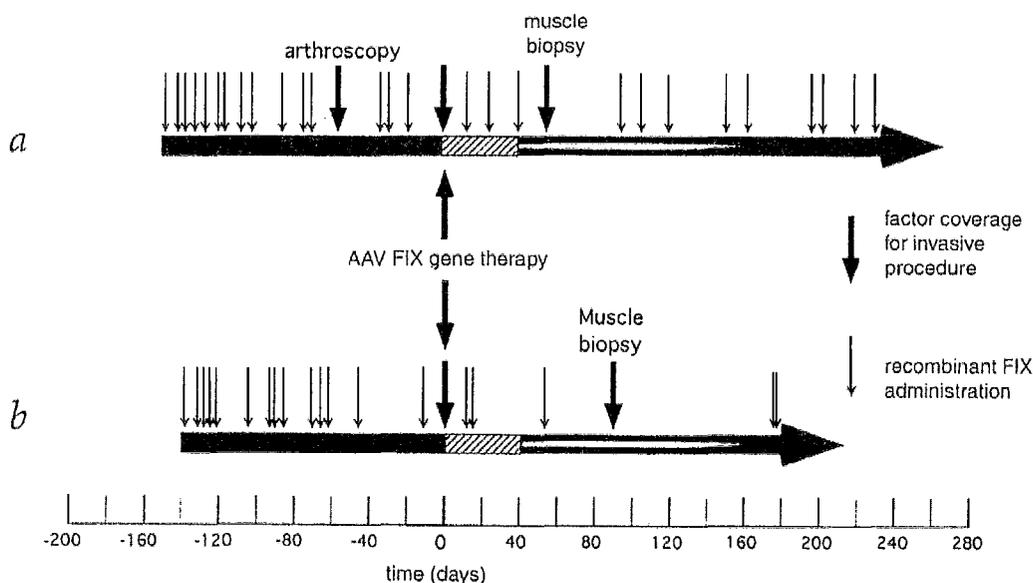
L'étude menée par Kay et ses collaborateurs (Avigen Inc.) a rapidement donné lieu à des publications scientifiques (46) concernant les trois premiers patients traités et qui ont reçu les doses de vecteurs les plus basses prévues (à savoir 2.10^{11} vecteurs/kg de poids corporel injectés par voie intramusculaire). Le transfert de gène et son expression ont été démontrés (PCR et Southern blot sur l'ADN extrait des biopsies musculaires) chez chacun des trois patients.

Tableau 15. Kay MA, 2000, (46) : quelques données concernant les 3 premiers patients enrôlés.

	Patient A	Patient B	Patient C
	38 ans européen	23 ans asiatique	67 ans européen
Niveau basal de facteur IX	<1%	<1%	<1%
Anticorps circulants	24%	<1%	<1%
Infections virales	VIH, Hépatite C	Hépatite C	Hépatite B

Concernant les résultats obtenus : parmi ces 3 patients, l'un (patient A) a eu une petite augmentation, persistante, de son niveau basal de facteur IX accompagné d'une réduction de ses besoins de facteur IX exogène... Un second (patient B) a montré une réduction importante de ses besoins en en facteur IX, bien que ses taux de facteur IX endogène aient toujours été inférieurs à 1%. Ce résultat étonnant a déjà été constaté lors d'essais sur la souris.

Fig 30. Kay MA, 2000 (46) : injections de facteur IX exogène avant et après thérapie génique.



Usage de facteur IX exogène par les patients A et B. Les lignes horizontales représentent le temps (échelle en bas du schéma, J0 = injection de l'AAV). Les flèches fines indiquent les injections de facteurs IX effectuées suite à des saignements spontanés. La zone hachurée indique la période durant laquelle l'expression du transgène n'est en théorie pas optimale (mode de répllication lent des AAV, formations de concatémères...).

- (a) Le jour de la biopsie musculaire, son niveau basal de facteur IX est inférieur à 1%, avec un aPTT de 61 secondes. 17 jours après cette biopsie, il est de 1,6% avec un aPTT de 48 secondes (même résultats retrouvés par la suite).
- (b) Pour ce patient les taux de facteur IX mesurés sont restés tout au long de l'expérience inférieurs à 0.3%. Son utilisation de facteur IX exogène a pourtant diminué de 80%.

Faisant suite à ces trois sujets, cinq autres individus ont été enrôlés (29). Trois d'entre eux ont reçu des doses intermédiaires de vecteurs ($5 \cdot 10^{11}$ vecteurs/kg), deux autres ont reçu des doses élevées ($2 \cdot 10^{12}$ vecteurs/kg). Pour ces cinq sujets, aucun résultat n'est disponible ; aucune toxicité n'a cependant été rapportée.

Enfin, les mêmes auteurs ont récemment obtenus l'autorisation d'initier chez d'autres individus un essai employant un AAV similaire à celui utilisé ci-dessus. Doté toutefois d'un promoteur $\alpha 1$ antitrypsine et d'un intron ApoA1 humain, celui-ci ciblera le tissu hépatique (injection par l'artère hépatique) (29).

2.3/ essai clinique de phase I employant l'électroporation

Bien que l'étude menée par TKT soit antérieure à celle d'Avigen Inc. ses résultats n'ont été publiés que récemment (69, 2001).

Les taux de facteur VIII mesurés se sont montrés chez 4 des 6 patients transitoirement supérieurs à leur niveau basal (patient 3, 4, 5, 6). Les valeurs ont généralement atteint 1 à 2% des taux normaux, avec un maximum de 4%. Dans le meilleur des quatre cas (sujet n°6 ayant reçu les doses les plus élevées de vecteurs), ce phénomène s'est accompagné d'une amélioration de l'état clinique pendant 10 mois. Ce patient a présenté une diminution des besoins en facteur VIII exogène (12339 à 30621 U/mois avant traitement contre 2040 à 7098 après thérapie génique).

Une diminution, certes moins importante, des besoins en facteur VIII se retrouve aussi chez les deux autres sujets ayant les taux plasmatiques de facteur VIII les plus élevés.

Chez tous les sujets sauf un, les taux de facteur mesurés après 10 mois étaient indétectables.

Le déclin des taux mesurés est attribué pour l'instant à l'élimination immunologique des fibroblastes transfectés ou à leur vieillissement naturel suite à la multiplication intense qu'ils ont subie *in vitro* (hypothèses les plus probables).

A travers les résultats obtenus il apparaît de plus, d'une part que la relation "besoin en facteur VIII exogène/taux de facteur circulant mesuré" n'est cependant pas évidente ; d'autre part que l'injection d'un nombre important de cellules produisant une faible quantité de facteur se révèle plus efficace que celle d'un nombre de cellules moindre mais produisant plus de facteur (patient 2 et 5).

Tableau 16. Roth DA, 2001 (69). Quelques données sur les 6 patients enrôlés.

Age	20 à 72 ans (46 ans en moyenne)
poids	50 à 91 kg (70 kg en moyenne)
Niveau basal de f VIII	< 0,8%
Infections virales	4 patients HIV + 5 patients HAV + 5 patients HBV + 6 patients HCV +
Nombre de cellules implantées	Patient n°1 : 100.10 ⁶ (in vitro : 0,8 UI/10 ⁶ cellules/jour) Patient n°2 : 100.10 ⁶ (in vitro : 4,9 UI/10 ⁶ cellules/jour) Patient n°3 : 100.10 ⁶ (in vitro : 1,9 UI/10 ⁶ cellules/jour) Patient n°4 : 400.10 ⁶ (in vitro : 1,8 UI/10 ⁶ cellules/jour) Patient n°5 : 400.10 ⁶ (in vitro : 1,6 UI/10 ⁶ cellules/jour) Patient n°6 : 400.10 ⁶ (in vitro : 6,7 UI/10 ⁶ cellules/jour)
Production de facteur VIII par ces cellules (rapportée au poids de chaque sujet)	Patient n°1 : 1,3 UI/kg/jour Patient n°2 : 5,4 UI/kg/jour Patient n°3 : 3,8 UI/kg/jour Patient n°4 : 10,4 UI/kg/jour Patient n°5 : 8,4 UI/kg/jour Patient n°6 : 36,0 UI/kg/jour

La voie d'introduction intraperitonéale choisie par les auteurs est quant à elle discutée : techniquement simple à réaliser, modérément invasive, elle pose plusieurs problèmes, le plus important étant probablement l'inaccessibilité des cellules implantées qui laisse en suspens plusieurs questions : par quels mécanismes l'expression protéique diminue-t-elle? L'organisme cherche-t-il à évacuer les cellules implantées? Celles-ci continuent-elles à croître *in vivo* suite à leur intense multiplication *in vitro*? Et si oui une formation néoplasique est-il possible? Enfin, même si cette méthode *ex vivo* prouve son efficacité, et se montre relativement plus sûre que les études *in vivo* (contrôle de la production de facteur VIII et des cellules avant implantation au sujet, pas d'usage de vecteurs viraux), elle risque de se voir reprocher son coût : la greffe autologue impose une technique individualisée, ce qui risque de limiter son développement à grande échelle.

2.4/ Essai clinique de phase I employant les rétrovirus

Les auteurs de cette étude n'ont pour l'instant publié aucun résultat. Cependant quelques informations sont données dans un article très récent (29) :

Les 13 sujets engagés seraient âgés de 18 à 55 ans, et atteints d'une hémophilie A sévère (taux de facteurs <1%). Tous seraient porteurs du virus de l'hépatite C et cinq d'entre eux VIH + (mais sans traitement anti-rétroviral et avec un taux de CD4 supérieur à 400 /mm³).

Les doses injectées ont été selon les sujets de $2,2 \cdot 10^7$, $9,2 \cdot 10^7$, $2,2 \cdot 10^8$, $4,4 \cdot 10^8$ et $8,8 \cdot 10^8$ vecteurs/kg.

Les taux de facteur VIII circulants se sont montrés chez 6 des sujets supérieurs à leur niveau basal à plusieurs reprises : en général 1 à 1,8% des taux normaux avec pour 3 des sujets des valeurs encore supérieures : des taux de 2,3%, 3%, 4,3% et 6,2% ont été mesurés. L'analyse PCR a quant à elle montré une persistance du vecteur dans les mononucléaires sanguins pendant plus de 6 mois. Chez trois des quatre sujets testés cette persistance se retrouvait encore après 1 an.

Dans tous les cas aucune toxicité, formation d'anticorps ou autres complications n'a été rapporté ; il n'y a pas eu d'accélération du développement des maladies virales en cours (VIH, HCV), pas de mutagénèse apparente, ni de détection d'élément viral dans le spermes des 13 sujets.

Si ces résultats intermédiaires sont insuffisants, ils apportent toutefois certaines réponses :

- 1/ Aux doses de vecteurs et voie d'administration employés la méthode se révèle sans effet secondaire.
- 2/ Le transgène peut persister pendant plus de 1 an (mononucléaires).
- 3/ Sa transmission est associée à une augmentation des taux basaux de facteurs VIII chez certains sujets et à une meilleure tolérance du facteur VIII exogène : la demi-vie du facteur injecté et son aire sous la courbe sont plus importants lors des administrations ayant eu lieu après thérapie génique.

Bilan : Sur 7 essais cliniques, 5 types de vecteurs très différents (rétrovirus, Adénovirus, AAV, greffe de fibroblastes après électroporation, oligonucléotides) seront donc étudiés. Ceci est important, d'une part parce que la communauté hémophile est une population hétérogène (dont une partie est viralement infectée : HIV, hépatites...) qui ne pourra pas forcément être traitée par un seul type de vecteur, d'autre part parce que ce développement des recherches sur plusieurs fronts favorise une certaine concurrence entre équipes et multiplie les alternatives possibles en cas d'échec d'une des voies.

Si ces essais de phase I réussissent, les essais de phase II regroupant des patients plus nombreux permettront d'évaluer l'efficacité des agents et d'identifier les réactions indésirables ou les risques quant à la sécurité du produit.



CONCLUSION



Le développement des moyens thérapeutiques mis à la disposition des hémophiles s'est accru de façon considérable au fur et à mesure de l'avancée des connaissances concernant la fonction des facteurs de coagulation, les mécanismes mis en route, la structure des gènes impliqués.

Une des étapes majeures dans ce domaine fut permise par le développement des techniques de synthèse de l'ADN recombinant : depuis l'isolement des gènes codant pour les facteurs VIII et IX, les progrès réalisés ont été spectaculaires.

Ainsi, entre l'isolement du gène du facteur VIII et le premier essai clinique de facteur recombinant sur l'homme, 3 années seulement se sont écoulées, et il n'a fallu que 3 ans de plus pour que la FDA approuve ce facteur comme suffisamment sûr pour autoriser son utilisation à large échelle dans la communauté hémophile. Ceci est en fait très rapide si on considère que le facteur VIII était à l'époque la plus grosse protéine jamais synthétisée par la technique de l'ADN recombinant (environ 50 fois plus grosse que l'insuline). Les progrès concernant le facteur IX ont été plus lents -15 années entre le clonage du gène (1982) et l'acceptation par la FDA (1997)- du fait du moindre intérêt accordé au facteur IX par les industries pharmaceutiques.

Quoi qu'il en soit, la rapidité des progrès effectués résulte de deux points :

- la grande expérience d'utilisation et de manipulation des produits dérivés du plasma,
- la nécessité de trouver un moyen de traitement sûr et efficace pour les hémophiles.

Mais nous entrons maintenant dans une ère nouvelle ; les modalités d'acceptation d'une thérapie génique pour l'hémophilie seront plus complexes puisque les risques potentiels (et les bénéfices) apportés par une telle technique sont à comparer avec les produits recombinants actuels et les produits de très haute pureté qui offrent d'ores et déjà aux patients une thérapie de substitution sûre et efficace. En fait ce qui, une fois la thérapie génique au point, pourrait faire pencher la balance dans le camp de cette technique est le coût significatif des traitements prophylactiques à base de facteur recombinant, traitements qui représentent pourtant une amélioration considérable pour les hémophiles sévères.

Bien que le début des essais cliniques chez l'être humain soit une étape encourageante, nous sommes encore loin d'une thérapie génique brevetée pour les hémophilies A et B: il est impossible de savoir quand exactement les programmes de thérapie génique seront efficaces sur l'homme avant de les avoir essayés sur lui. Les essais cliniques sont en effet une arène où plusieurs problèmes éthiques, médicaux et financiers devront être soulevés puis résolus.

Les chercheurs sont en revanche de plus en plus optimistes et croient que d'importantes percées sont sur le point d'être réalisées et que la thérapie génique pourrait devenir une réalité au cours de la décennie à venir. Il nous faut toutefois garder à l'esprit que :

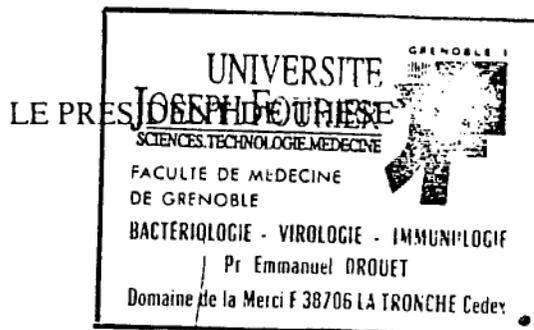
- Un hémophile ne produira probablement pas de facteurs VIII ou IX à des taux normaux. Au mieux il pourrait en produire suffisamment pour devenir ce qu'on appelle un hémophile mineur (5 à 25% des taux normaux de facteurs). Il pourrait même avoir besoin de concentrés de facteurs en cas de saignements graves ou de chirurgie.
- L'injection de vecteur et du matériel génétique devra probablement être répétée. Ceci est difficile à prévoir (selon les estimations il pourrait s'agir d'une injection par année ou de une injection toutes les quelques années).
- La mutation de l'hémophile n'aura pas été corrigée ; il transmettra toujours le gène de l'hémophilie à ses filles.

Vu et permis d'imprimer

Grenoble, le

LE DOYEN

P. DEMENGE



E. DROUET



BIBLIOGRAPHIE



- 1 Armentano D, Thompson AR, Darlington G, Woo SL. Expression of human factor IX in rabbit hepatocytes by retrovirus-mediated gene transfer: potential for gene therapy of hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87 (16) : 6141-5
- 2 Axelrod JH, Read MS, Brinkhous KM, Verma IM. Phenotypic correction of factor IX deficiency in skin fibroblasts of hemophilic dogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87 (13) : 5173-7
- 3 Balague C, Zhou J, Dai Y et al. Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector. *Blood* 2000, 95 (3) : 820-8
- 4 Bartoli MH. Cours de 4^{ème} année de pharmacie 1998/1999. Etats hémorragiques, anomalies de la coagulation
- 5 Baru M, Axelrod JH, Nur I. Liposome-encapsulated DNA-mediated gene transfer and synthesis of human factor IX in mice. *Gene* 1995, 161 (2) : 143-50
- 6 Beal PA, Derwan PB. second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple helix formation. *Science* 1991, 251 : 1360-3
- 7 Bi L, Sarkar R, Naas T, et al./ Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting : RNA and protein studies. *Blood* 1996, 88 (9) : 3446-50
- 8 Brinkhous KM, Hedner U, Garris JB, Diness V, Read MS. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86 (4) : 1382-86
- 9 Chao H, Mao L, Bruce AT, Walsh CE. Sustained expression of human factor VIII in mice using a parvovirus-based vector. *Blood* 2000, 95 (5) : 1594-9
- 10 Connelly S, Andrews JL, Gallo AM et al. Sustained phenotypic correction of murine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood* 1998, 91 (9) : 3273-81
- 11 Connelly S, Andrews JL, Gallo-Penn AM, Tagliavacca L, Kaufman RJ, Kaleko M. Evaluation of an adenoviral vector encoding full-length human factor VIII in hemophiliac mice. *Thromb Haemost* 1999, 81 (2) : 234-9
- 12 Connelly S, Gardner JM, Lyons RM, McClelland A, Kaleko M. Sustained expression of therapeutic levels of human factor VIII in mice. *Blood* 1996, 87 (11) : 4671-7
- 13 Connelly S, Kaleko M. Haemophilia A gene therapy. *Haemophilia* 1998, 4 (4) : 380-8

- 14 Connolly S, Mount J, Mauser A et al. Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood* 1996, 88 (10) : 3846-53
- 15 Dai Y, Roman M, Naviaux RK, Verma IM. Gene therapy via primary myoblasts : long-term expression of factor IX protein following transplantation in vivo. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992, 89 : 10892-5
- 16 Dwarki VJ, Belloni P, Nijjar et al. Gene therapy for hemophilia A: production of therapeutic levels of human factor VIII in vivo in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92 (4) : 1023-7
- 17 Eisensmith RC, Woo SL. Viral vector-mediated gene therapy for hemophilia B. *Thromb Haemost* 1997, 78 (1) : 24-30
- 18 Engelhardt JF, Xuehai Y, Doranz B, Wilson JM. ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decrease inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91 (13) : 6196-200
- 19 Evans GL, Morgan RA/ Genetic induction of immune tolerance to human clotting factor VIII in a mouse model of hemophilia A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95 (10) : 5734-9
- 20 Fallaux FJ, Hoeben RC, Briet E. State and prospects of gene therapy for the hemophilias. *Thromb Haemost* 1995, 74 (1) : 266-73
- 21 Fang B, Eisensmith RC, Wang H et al. Gene therapy for hemophilia B: host immunosuppression prolongs the therapeutic effect of adenovirus-mediated factor IX expression. *Hum Gene Ther* 1995, 6 (8) : 1039-44
- 22 Fakharzadeh SS, Zhang Y, Sarkar R, Kazazian HH. Correction of factor VIII deficiency in a murine model for hemophilia A through transplant of factor VIII-expressing skin. *Blood* 1998 (abstract) , 92 : 297a
- 23 Ferry N, Duplessis O, Houssin D, Danos O, Heard JM. Retroviral gene transfer into hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88 (19) : 8377-81
- 24 Fewell JG, MacLaughlin F, Mehta V et al. Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroporation. *Mol. Ther.* 2001, 3 (4) : 574-83
- 25 Furie BC, Furie B/ Biosynthesis of factor IX: implications for gene therapy. *Thromb Haemost* 1995, 74 (1) : 274-7
- 26 Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL et al. In vivo evaluation of an adenoviral vector encoding canine factor VIII: High level, sustained expression in hemophiliac mice. *Hum Gene Ther* 1999, 10 : 1791-1802

- 27 Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL et al. Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood* 2001, 97 (1) : 107-13
- 28 Gerrard AJ, Austen DE, Brownlee GG. Recombinant factor IX secreted by transduced human keratinocytes is biologically active. *Br J Haematol* 1996, 95 (3) : 561-63
- 29 Gilbert C, White II. Gene therapy in hemophilia : clinical trials update. *Thromb Haemost* 2001, 86 : 172-7
- 30 Giles AR, Tinlin S, Greenwood R. A canine model of hemophilic (factor VIII:C) bleeding. *Blood* 1982, 60 : 727-30
- 31 Gnatenko DV, Saenko EL, Jesty J, Cao LX, Hearing P, Bahou WF. Human factor VIII can be packaged and functionally expressed in an adeno-associated virus background: applicability to haemophilia A gene therapy. *Br J Haematol* 1999, 104 (1) : 27-36
- 32 Greengard JS, Jolly DJ. Animal testing of retroviral-mediated gene therapy for factor VIII deficiency. *Thromb Haemost* 1999, 82 (2) : 555-61
- 33 Gu W, Brooks M, Catalfamo J, Ray J, Ray K. Two distinct mutations cause severe hemophilia B in two unrelated canine pedigrees. *Thromb Haemost* 1999, 82 (4) : 1270-5
- 34 Hagstrom JN, Couto LB, Scallan C et al. Improved muscle-derived expression of human coagulation factor IX from a skeletal actin/CMV hybrid enhancer/promotor. *Blood* 2000, 95 (8) : 2536-42
- 35 Herzog RW, Hagstrom JM, Kung SH et al. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997, 94 (11) : 5804-9
- 36 Herzog RW, High KA. Adeno-associated virus-mediated gene transfer of factor IX for treatment of hemophilia B by gene therapy. *Thromb Haemost* 1999, 82 (2) : 540-6
- 37 Herzog RW, Yang EY, Couto LB et al. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med* 1999, 5 (1) : 56-63
- 38 Hoeben RC, Einerhand MP, Briet E, van Ormondt H, Valerio D, van der Eb AJ. Toward gene therapy in haemophilia A: retrovirus-mediated transfer of a factor VIII gene into murine haematopoietic progenitor cells. *Thromb Haemost* 1992, 67 (3) : 341-5

- 39 Hoeben RC, Fallaux FJ, Cramer SJ et al. Expression of the blood factor VIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region. *Blood* 1995, 85 (9) : 2447-54
- 40 Hortelano G, Al-Hendy A, Ofosu FA, Chang PL. Delivery of human factor IX in mice by encapsulated recombinant myoblasts: a novel approach towards allogeneic gene therapy of hemophilia B. *Blood* 1996, 87 (12) : 5095-103
- 41 Hortelano G, Chang PL. Gene therapy for hemophilia. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000, 28 (1) : 1-24
- 42 Israel DI, Kaufman RJ. retroviral-mediated transfer and amplification of a functional human factor VIII gene. *Blood* 1990, 75 (5) : 1074-80
- 43 Jones P. *L'hémophilie et la vie*. Editions Frison-Roche. 1992.
- 44 Kaufman RJ. Advances toward gene therapy for hemophilia at the millennium. *Hum Gene Ther* 1999, 10 (13) : 2091-107
- 45 Kay MA, High K. Gene therapy for the hemophilias. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96 (18) : 9973-5
- 46 Kay MA, Landen CN, Rothenberg SR et al. In vivo hepatic gene therapy: complete albeit transient correction of factor IX deficiency in hemophilia B dogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91 (6) : 2353-7
- 47 Kay MA, Manno CS, Ragni MV et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 2000, 24 (3) : 257-61
- 48 Kay MA, Rothenberg S, Landen CN et al. In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science* 1993, 262 (5130) : 117-9
- 49 Kessler PD, Podsakoff GM, Chen X et al. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996, 93 (24) : 14082-7
- 50 Kochanek S. development of high-capacity adenoviral vectors for gene therapy. *Thromb Haemost* 1999, 82 (2) : 547-51
- 51 Koeberl DD, Alexander IE, Halbert CL, Russel DW, Miller AD. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997, 94 (4) : 1426-31

- 52 Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CS. In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Med* 1998, 4 : 285-90
- 53 Kundu RK, Sangiorgi F, Wu LY et al. Targeted inactivation of the coagulation factor IX gene causes hemophilia B in mice. *Blood* 1998, 92 (1) : 168-74
- 54 Kung S, Hagstrom JN, Cass D et al. Human factor IX corrects the bleeding diathesis of mice with hemophilia B. *Blood* 1998, 91 (3) : 784-90
- 55 Kurachi K, Yao SN. Gene therapy of hemophilia B. *Thromb Haemost* 1993, 70 (1) : 193-97
- 56 Liles D, Landen CN, Monroe DM et al. Extravascular administration of factor IX: potential for replacement therapy of canine and human hemophilia B. *Thromb Haemost* 1997, 77 (5) : 944-8
- 57 Lin HF, Maeda N, Smithies O, Straight DL, Stafford DW. A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. *Blood* 1997, 90 (10) : 3962-66
- 58 Ljung RC. Prophylactic infusion regimens in the management of hemophilia. *Thromb Haemost* 1999, 82 (2) : 525-30
- 59 Lozier JN, Metzger ME, Donahue RE, Morgan RA. The rhesus macaque as an animal model for hemophilia B gene therapy. *Blood* 1999, 93 (6) : 1875-81
- 60 Lusher JM. Gene therapy for hemophilia A and B: patient selection and follow-up, requirements for a cure. *Thromb Haemost* 1999, 82 (2) : 572-5
- 61 Michou AI, Christ M, Pavirani A, Mehtali M. [Genetic therapy for hemophiliacs--therapeutic potential and technological limits]. [Article in French]. *Transfus Clin Biol* 1997, 4 (3) : 251-61
- 62 Nakai H, Herzog R, Hagstrom JN et al. AAV-mediated gene transfer of human blood coagulation factor IX into mouse liver. *Blood* 1998, 91 (12) : 4600-07
- 63 Naldini L. In vivo gene delivery by lentiviral vectors. *Thromb Haemost* 1999, 82 (2) : 552-4

- 64 Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93 (21) : 11382-8
- 65 Nathwani AC, Davidoff A, Hanana H, Zhou JF, Vanin EF, Nienhuis AW. Factors influencing in vivo transduction by recombinant adeno-associated viral vectors expressing the human factor IX cDNA. *Blood* 2001, 97 (5) : 1258-65
- 66 Palmer TD, Thompson AR, Miller DA. Production of human factor IX in animals by genetically modified skin fibroblasts : potential therapy for hemophilia B. *Blood* 1989, 73 (2) : 438-45
- 67 Qian J, Borovok M, Bi L, Kazazian HH, Hoyer LW. Inhibitor antibody development and T Cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb Haemost* 1999, 81 : 240-4
- 68 Qian J, Collins M, Sharpe AH, Hoyer LW. Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A. *Blood* 2000, 95 (4) : 1324-9
- 69 Scandella D, Mattingly M, de Graaf S, Fulcher CA. Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. *Blood* 1989, 74 (5) : 1618-26
- 70 Scharfmann R, Axelrod JH, Verma IM. Long-term in vivo expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88 (11) : 4626-30
- 71 Snyder RO, Miao C, Meuse L et al. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 1999, 5 (1) : 64-70
- 72 Snyder RO, Miao CH, Patijn GA et al. Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 1997, 16 (3) : 270-6
- 73 StLouis D, Verma IM. An alternative approach to somatic cell gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85 (9) : 3150-54
- 74 Strachan T, Read AP. *Génétique moléculaire humaine*. Editions Flammarion-médecine-science.1998.
- 75 VandenDriessche T, Vanslembrouck V, Goovaerts I et al. Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after in vivo retroviral gene transfer in factor VIII-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96 (18) : 10379-84

- 76 Verma IM, Nikunj S. Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 1997, 389 : 239-42
- 77 Walter J, You Q, Hagstrom JH, Sands M, High K. Sustained expression of human factor IX following repeat administration of an adenoviral vector in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93 (7) : 3056-61
- 78 Wang L, Nichols TC, Read MS, Bellinger DA, Verma IM. Sustained expression of therapeutic level of factor IX in hemophilia B dogs by AAV-mediated gene therapy in liver. *Mol ther* 2000, 1 (2) : 154-8
- 79 Wang L, Takabe K, Bidlingmaier SM, III CR, Verma IM. Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96 (9) : 3906-10
- 80 Wang L, Zoppe M, Hackeng TM, Griffin JH, Lee KF, Verma IM. A factor IX-deficient mouse model for hemophilia B gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94 (21) : 11563-6
- 81 White GC, Roberts HR. Gene therapy for hemophilia: a step closer to reality. *Mol Ther* 2000, 1 (3) : 207-8
- 82 White SJ, Page SM, Margaritis P, Brownlee GG. Long-term expression of human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocytes in vivo. *Hum Gen Ther* 1998, 9 (8) : 1187-95
- 83 Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91 (7) : 2353-7
- 84 Yao S, Kurachi K. Expression of human factor IX in mice after injection of genetically modified myoblasts. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992, 89 (9) : 3957-61
- 85 Yao SN, Wilson JM, Nabel EG, Kurachi S, Hachiya HL, Kurachi K. Expression of human factor IX in rat capillary endothelial cells : toward somatic gene therapy for hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88 (18) : 8101-5
- 86 Yoon K, Cole-Strauss A, Kmiec EB. Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93 (5) : 2071-6
- 87 Zatloukal K, Cotton M, Bergen M, Schmidt W, Wagner E, Birnstiel ML. In vivo production of human factor VIII in mice after intrasplenic implantation of primary fibroblasts transfected by receptor mediated, adenovirus-augmented gene delivery. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994, 91 (11) : 5148-52

- 88 Zhang WW, Josephs SF, Zhou J et al. Development and application of a minimal-adenoviral vector system for gene therapy of hemophilia A. *Thromb Haemost* 1999, 82 (2) : 562-71
- 89 Zhang Z, Eriksson M, Blomback M, Anvret M. A new approach to gene therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997, 8 (Suppl 2) : 39-42

Sites Internet à consulter :

- Web1: www.genethon.fr/biblio/aav.html , site en français, pour un point de vue détaillé sur les AAV
- Web2: www.genethon.fr/biblio/Vec-synth.html, site en français, pour un aperçu général sur les méthodes non virales
- Web3: www.hemophilia.ca/francais, site en français, pour avoir plus d'explications sur l'hémophilie et la thérapie génique (site très clair)
- Web4: www.hemophilia.org/recherche/news pour les nouveautés, les derniers résultats expérimentaux
- Web5: www.kelleycom.com/pencont.html , site en anglais, pour des articles généraux sur la thérapie génique appliquée à l'hémophilie, pour des lettres explicatives aux parents souhaitant s'informer sur ce domaine, pour des informations sur l'essai humain mis en place par TKT
- Web6: www-micro.msb.le.anticorps.uk/335/, site en anglais, pour une définition des rétrovirus, adénovirus, AAV
- Web7: www.signalsmag.com pour les expériences en cours sur l'homme
- Web8: www.transgene.fr/fr/gene0062.html , site en anglais, pour une définition générale de la thérapie génique



LISTE DES ABREVIATIONS
UTILISEES



Concernant les facteurs de coagulation :

f IX = facteur IX

fIXa = facteur IX activé

hfIX = facteur IX humain

cfIX = facteur IX canin

f VIII = facteur VIII

fVIIIa = facteur VIII activé

BDD fVIII = (gène du) facteur VIII délété du domaine B (B Domain Deleted)

FL fVIII = (gène du) facteur VIII entier (Full Length)

hfVIII = facteur VIII humain

cfVIII = facteur VIII canin

concernant les virus employés (ou parties de virus) :

AAV = Adeno Associated Virus ou virus adéno-associés

CMV = Cyto Megalo Virus

HBV = Virus de l'hépatite B

HCV = Virus de l'hépatite C

MLV = Murine Leukemia Virus

RSV = Routh Sarcoma Virus

VSV = Vesicular Stomatitis Virus

VIH (ou HIV) = Virus de l'immunodéficience Humaine

LTR = Long Terminal Repeat

LSP = Liver Specific Promotor

MFG

MCK = Muscle Cratine Kinase

Concernant l'hémostase :

TCA = Temps de Céphaline + activateur

TQ = Temps de Quick

TS = Temps de Saignement

TT = Temps de Thrombine

Concernant le génome et les protéines :

ADN et DNA = Acide Désoxyribo Nucléique

cDNA = région codante du DNA

ARN = Acide Ribo Nucléique

A = Adénine

T = Thyminine

G = Guanine

C = Cytosine

AA = Acides Aminés

Chr = Chromosome

BiP = Immunoglobulin Binding Protein
FVW = Facteur Von Willebrand

Concernant le système immunitaire :

CPA = Cellules Présentant l'Antigène
CTL = Lymphocyte T Cytotoxique
SCID = Severe Combined ImmunoDeficiency

Divers :

Min = minutes
Sec = secondes
T1/2 = demi-vie d'élimination
Pb = problèmes



Serment des Apothicairees

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



MUSSO Laure

THERAPIE GENIQUE APPLIQUEE A L'HEMOPHILIE

THESE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
GRENOBLE, ANNEE 2001

RESUME :

L'hémophilie est une maladie héréditaire liée au chromosome X. Elle entraîne un trouble de la coagulation lié à un déficit en facteur VIII (hémophilie A) ou en facteur IX (hémophilie B). Ceci se traduit cliniquement par des saignements externes et internes, qui à long terme, induisent des dommages articulaires chez les patients atteints d'une forme sévère.

Deux types de traitement existent aujourd'hui : les produits recombinants mis au point par génie génétique et les produits dérivés du plasma. Tous deux sont utilisés pour apporter à l'hémophile le facteur de coagulation manquant à son organisme (injection IV). Ils peuvent être employés selon deux modes : substitutif (en cas de saignement uniquement) ou prophylactique.

Aujourd'hui, grâce à la thérapie génique, une troisième possibilité de traitement se met en place : faire synthétiser par l'organisme lui-même le facteur manquant, en lui apportant le gène nécessaire ou en corrigeant ponctuellement la mutation génétique en cause.

Les méthodes explorées pour transférer le gène utilisent des vecteurs viraux (rétrovirus, adénovirus, virus adéno-associés) et non viraux (liposomes, plasmides électroporés...) ; celles visant une correction du gène font appel principalement à des chimères ADN/ARN.

Ces techniques, développées pour certaines depuis une quinzaine d'année, ont fait l'objet de nombreuses expériences sur l'animal. Leur champ d'application se déplace aujourd'hui vers l'homme avec, d'ores et déjà, quatre essais cliniques de phase I en cours.

Cet espoir très prometteur, que l'on doit surveiller de près de par les risques qu'il comporte, fait l'objet dans ce document d'une revue bibliographique.

MOTS CLES : Hémophilie - Thérapie génique - Vecteurs viraux - Vecteurs non viraux - Essais cliniques.

JURY : Monsieur E. DROUET : Président du jury
Madame M.H. BARTOLI : Directeur de thèse
Madame A. PAGNIER : Assistant Chef de Clinique

DATE DE SOUTENANCE : le 10 septembre 2001

[Données à caractère personnel]