

GÉNOME ET BIOTECHNOLOGIE: EXEMPLE DU TRANSFERT DE GENES CONTRE L'INFECTION EXPÉRIMENTALE À VIH

Par K. SANHADJI et J. L. TOURAINÉ,
Labo. des déficits immunitaires et d'immunologie
des transplantations,
Faculté de Médecine RTH Laënnec et
Hôpital E. Herriot, Lyon, France.

INTRODUCTION

En matière de SIDA, les progrès de la recherche ont abouti à des traitements très actifs associant plusieurs médicaments. Ces traitements d'un grand bénéfice se heurtent, dans nos pays, à des difficultés liées aux résistances acquises par le virus ou à des effets secondaires et à une précarité des moyens dans les pays en voie de développement.

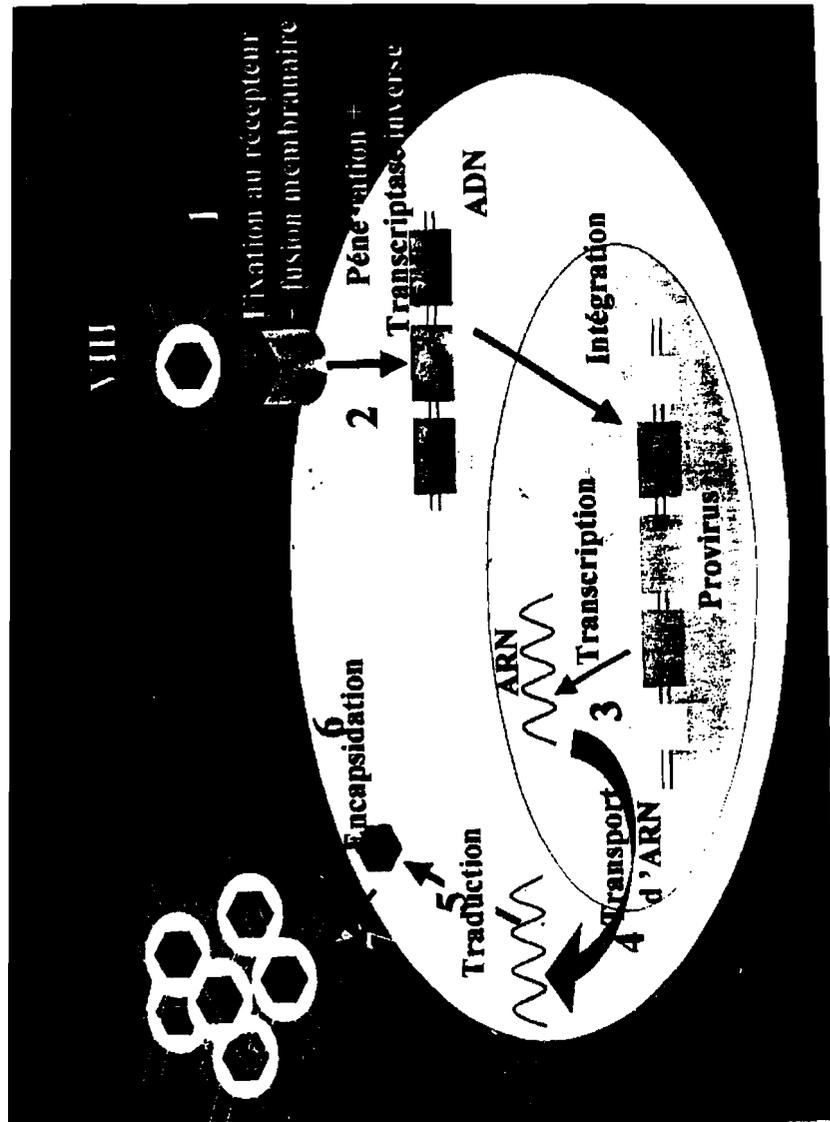
Un grand espoir est suscité par les résultats expérimentaux prometteurs, chez l'animal de laboratoire, en matière de thérapie génique anti-VIH. Ainsi, son objectif consiste à introduire dans l'organisme des cellules modifiées par l'adjonction d'un gène d'intérêt, grâce auquel elles fabriqueraient et libéreraient en permanence des facteurs antiviraux *in vivo*.

Les travaux de recherche en cours définiront les meilleures modalités de ce traitement en vue d'une utilisation chez l'homme et dans la perspective d'une efficacité durable.

Pour des raisons de simplicité, cette mise au point, se basera sur le schéma du cycle viral au sein de la cellule cible infectée par le VIH. Les stratégies d'intervention de la thérapie génique anti-VIH peuvent être retrouvées grâce aux points d'impact indiqués dans illustration.

SCHEMA (en annexe: à incruster)

Légende : Cibles moléculaires pour une thérapie génique du SIDA



Chaque étape du cycle du VIH peut constituer une cible d'intervention antivirale. Les agents génétiques antiviraux en évaluation dans le monde sont: étape 1: CD4 soluble, anticorps anti-Env ou sécrétés; étape 2: ribozymes, anticorps intracellulaires antitranscriptase inverse, IFN; étape 3: leurres de la séquence TAR, cible de TAT, bwbiteurs transdominants de TAT, ribozymes, ÀRN anti-sens, IFN; étape 4: inhibiteurs transdominants REV, leurres de la séquence RRE; étape 5: ARN anti-sens, ribozymes; étape 6: inhibiteurs transdominants GAG, CD4 intracellulaires, IFN; étape 7: anticorps anti-Env, " suicide induit ".

1.- DIVERSES STRATÉGIES D'INTERVENTION

a.- Reconstitution génétique des mécanismes naturels de défenses

Son objectif est de transférer un gène, connu pour la production d'un facteur antiviral dans des cellules (moelle osseuse, lymphocytes, cellules fibroblastiques) prélevées chez le sujet infecté par le VIH et ensuite réinjectées. Des petits organes artificiels (éponges ou organoïdes) incluant des gènes thérapeutiques peuvent, aussi, être construits et implantés chez le patient. Ils fonctionnent comme une entité autonome capable de libérer le facteur ou la protéine thérapeutique.

La thérapie génique expérimentale par apport de molécules ayant un effet antiviral est illustrée par les résultats des travaux suivants:

- Molécule CD4 soluble (sCD4): Il s'agit d'une protéine leurre du virus, car le CD4 est le récepteur naturel du VIH (gp120) à la surface des cellules cibles. Les performances de cette protéine thérapeutique ont été améliorées en lui associant d'autres fragments de protéines telle la chaîne lourde des immunoglobulines G. Ainsi, l'immunoadhésine sCD4IgG a l'avantage d'être dégradée plus lentement dans l'organisme que sCD4.
- Anticorps neutralisants: Ce sont des anticorps dirigés contre l'enveloppe du virus. Beaucoup de ces anticorps, en particulier anti-gp120, sont inefficaces à cause des nombreuses mutations du VIH. Un anticorps (2F5) dirigé contre la gp41, protéine de fusion du VIH aux cellules cibles, semble être intéressante car il est doué d'un fort pouvoir neutralisant vis à vis du virus. Il est spécifique d'une région assez conservée de la gp41 du VIH 1.

Ces deux molécules (sCD4-IgG et 2F5) libérées dans le système d'organoïde ont été testées dans le modèle de la souris immunodéficente SCID "humanisée" (protocole de greffe de souris avec un mini système immunitaire humain dite souris SCID-Hu). Le suivi de la charge virale plasmatique et cellulaire et de la réplication du VIH1 après culture de cellules

prélevées chez la souris SCID-HU ainsi traitée a permis d'observer une très forte réduction, de 1 000 à 1 000 000 fois, de la charge et de la propagation virales in vivo.

- Interférons (IFN), interleukines (IL): Il est bien connu que l'IFN constitue l'un des plus puissants systèmes de défenses développées par la cellule contre les infections virales. Dans le cas du SIDA, le VIH contourne les défenses immunitaires de l'hôte par destruction des lymphocytes T4 et aussi par répression de la synthèse des IFN.

L'activité anti-VIH des gènes des IFN α , β et γ a été testée dans le modèle de la souris SCID-HU inoculée avec le virus in vivo. L'infection par VIH chez souris SCID-HU est associée à une forte induction de la production des IFN α , β et γ inhibant la réplication et la charge virale, alors que l'IFN γ n'inhibe presque pas l'infection, bien qu'il soit efficacement exprimé. Ici, la synthèse des IFN est inductible par le VIH. Elle est sous le contrôle du gène TAT du VIH. En conséquence, la synthèse de l'IFN s'arrête dès que l'infection par le VIH disparaît.

Une autre approche a permis de faire exprimer constitutivement l'IFN α à des niveaux faibles mais en continu. Ce système a permis de rendre les cellules résistantes à une pénétration du VIH. Cependant, une expression constitutive des IFN pourrait être à l'origine d'une limitation potentielle à une future évaluation clinique. L'impact d'une expression in vivo continue de l'IFN même à des doses faibles devra être attentivement évalué avant une application chez l'homme.

Le gène de l'IFN α a été sélectionné comme meilleur candidat anti-VIH. Un protocole, chez le singe, devrait être finalisé.

On peut, aussi, envisager d'amplifier grâce aux gènes de certaines interleukines des fonctions immunitaires ayant pour conséquence de combattre la multiplication du virus. La stratégie des IL n'est pas celle qui est la plus favorisée. Le réseau de ces cytokines est très complexe.

b- Inhibition de certaines fonctions régulatrices du cycle VIH

L'objectif de cette approche est de créer dans l'organisme des cellules incapables de multiplier le virus tout en restant vivantes et fonctionnelles (immunisation intracellulaire). Il s'agit d'induire une résistance cellulaire vis à vis de l'infection ou de la propagation du VIH par transferts de gènes codant pour des molécules (ARN ou protéines) inhibant une des étapes précoces du cycle viral, telles que la pénétration du virus dans la cellule, la transcription du génome viral, le transport des ARN viraux vers le cytoplasme ou encore l'accumulation cytoplasmique de ces ARN. On peut citer:

- **Inhibition des fonctions régulatrices des protéines TAT et REV du VIH.** : Produites très précocement durant le cycle viral, les protéines TAT et REV sont essentielles à l'activation du VIH: TAT permet l'élongation de la transcription des gènes viraux et REV favorise le transport, vers le cytoplasme des ARN codant pour les protéines structurales. Les études, au niveau des gènes TAT et REV, ont permis de démontrer que certaines mutations dirigées affectant certains domaines d'activation pouvaient engendrer des mutants ayant perdu toute activité activatrice du VIH mais surtout capables de bloquer l'action des protéines natives en prenant leurs places par phénomène de compétition. Ainsi dans nos travaux, ces mutants inhibiteurs transdominants TAT et REV exprimés simultanément *in vitro* ou *in vivo* dans le modèle animal SCID-Hu a permis, d'une manière remarquable, l'inhibition presque totale de la propagation du VIH. L'équipe G. Nabel de l'université du Michigan a pu, avec un variant REV-MLO seul, conférer un état antiviral aux cellules. Un essai clinique de phase 1, chez des enfants infectés par VIH, a été démarré par l'équipe américaine.
- **Transdominant négatif GAG** : La production accrue de protéines anormales de la structure de la capsid du VIH empêche l'association et l'assemblage correct des virions. Les expériences *in vitro*, utilisant des transdominants négatifs du gène GAG du VIH, ont montré l'incapacité de ces virus mutants à infecter des cellules cibles.
- **Gènes codant pour les ribozymes, les ARN leurres et ARN anti-sens** : D'autres stratégies de thérapie génique du SIDA sont également l'objet d'une intense investigation par de nombreuses équipes. Certaines de ces stratégies présentent des avantages particuliers. Les gènes codant pour des ribozymes ou pour des leurres TAR et RRE sont capables de conférer une résistance cellulaire significative à l'infection virale. Ces molécules d'ARN, dont les modes d'action respectifs consistent à cliver spécifiquement les ARN viraux et à neutraliser l'activité des protéines TAT et REV par fixation des protéines virales sur ces leurres, ne sont pas codantes et ne peuvent donc être à l'origine d'un rejet immunologique des cellules infectées. Les ribozymes, en cours d'évaluation, sont dirigés pour la plupart contre le gène GAG de VIH. La dégradation des ARN viraux a ici l'avantage d'interférer, tant avec des étapes précoces du cycle viral, qu'avec des étapes tardives.

Quant à l'ARN anti-sens, le gène qu'on veut introduire dans les cellules est un gène viral qui fabrique un ARN messenger "anti-sens" de l'ARN messenger du virus. L'avantage de cet ARN messenger anti-sens est qu'il va se combiner, en s'hybridant, avec l'ARN messenger du virus et bloquer son fonctionnement en l'empêchant de donner naissance aux protéines virales. Les ARN anti-sens les plus étudiés sont dirigés contre les

gènes TAT, REV et ENV du VIH. Pour une répression virale efficace, leur niveau d'expression doit être plus élevé. Leur utilisation paraît, actuellement, moins intéressante.

Dans ce volet, la voie toxigénétique mérite d'être signalée. Elle est basée sur l'introduction, dans les lymphocytes T4+ et les macrophages, un gène qui fabrique une toxine végétale, bactérienne ou virale. La fabrication, induite par le VIH lui-même, d'une très faible quantité de cette toxine suffit à tuer la cellule. Le gène suicide toxique le plus couramment utilisé est le gène de l'enzyme thymidine kinase de l'herpès simplex (HSV). Sous le contrôle des protéines du VIH et en présence de Ganciclovir ou d'Acyclovir, l'accumulation de produits phosphorylés par la kinase se traduit par une toxicité cellulaire telle que rapportée par les travaux de D. Klatzmann.

- **Cellules suicides:** cette approche consiste à modifier les cellules hématopoïétiques de manière que l'infection par VIH induise la synthèse de produit toxique entraînant la mort de la cellule avant toute production de nouvelles particules virales. Le concept est séduisant et a démontré son efficacité in vitro et dans le modèle de la souris SCID-HU in vivo. Son application ne peut être envisagée, actuellement, chez l'homme en raison de la nécessité d'infecter un très large pourcentage de la population cellulaire cible pour espérer la protéger.

2.- LIMITES, MAIS RECHERCHES EN PROGRÈS

a- Vecteurs

L'insertion d'un ou plusieurs gènes dans la cellule constitue une étape primordiale dans le transfert génique. En général, on a recours à des vecteurs viraux qui servent de "locomotive" pour véhiculer le gène thérapeutique et l'insérer correctement dans les cellules à modifier. Les vecteurs qui sont le plus souvent utilisés sont des fragments de rétrovirus murins capables d'infecter des cellules humaines. Ce sont des vecteurs intéressants mais n'infectent que les cellules en division.. Ils ont été utilisés avec succès dans la thérapie génique chez l'enfant atteint de déficit immunitaire primif. En matière de SIDA, les adénovirus sont des candidats dans le transfert de gènes mais font l'objet d'une réponse immunitaire comme c'est le cas de la thérapie génique de la mucoviscidose. C'est pourquoi les vecteurs adénoviraux de nouvelle génération sont envisagés.

La vectorologie, nouvelle discipline, est à l'œuvre dans la mise au point de nouveaux vecteurs (vecteurs synthétiques, liposomes ...).

La pérennité de l'expression *in vivo* d'un gène transféré reste encore une inconnue. L'introduction des deux gènes thérapeutiques sCD4-IgG et anti-gp41 constitue déjà un niveau de sécurité éprouvé dans le modèle murin SCID-HU.

a- Cellules souches hématopoïétiques

Introduire un gène thérapeutique dans les lymphocytes CD4+ périphériques ne constitue pas une solution car leur durée de vie est courte.

Ces cellules sont issues de la moelle osseuse et sont présentes dans le sang. Pour des raisons d'efficacité, l'introduction de gènes d'intérêt dans les cellules souches hématopoïétiques en particulier les cellules CD34+, va donner naissance à des cellules dans le sang, les ganglions, la rate, le thymus indéfiniment protégées. Il reste, néanmoins, difficile d'isoler actuellement les cellules souches CD34+ pures. De plus, il est difficile de transformer, avec les outils actuels, un nombre suffisant de ces cellules souches pour obtenir dans la descendance un grand nombre de lymphocytes ou de macrophages résistants. La reconstitution hématopoïétique des souris SCID par greffe de fragments thymiques fœtaux humains et administration de cellules souches humaines génétiquement modifiées constituent une amélioration notable du système.

CONCLUSION

Bien que certaines stratégies de thérapie génique aient obtenu *in vitro* des résultats encourageants, il est évidemment prématuré de préjuger d'une réelle efficacité clinique, quelle que soit l'approche considérée. D'autant que les évaluations *in vivo* chez les souris SCID-Hu ou, mieux, chez des macaques, sont aujourd'hui encore limitées. pendant, il faut se rappeler que des progrès significatifs récents dans le domaine de la génétique du génome humain en général et de la thérapie génique en particulier pourront profondément modifier le tableau des années à venir.