

Thérapie génique des maladies de Gaucher et de Fabry : état actuel et perspectives

par Sylvie Fabrega^{1,2} et Pierre Lehn¹

1. INSERM U458, Hôpital Robert Debré, 48, Bd Sérurier, 75019 Paris. 2. INSERM U510, Centre d'Études Pharmaceutiques, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Chatenay-Malabry. Correspondance : plehn@infobiogen.fr

Reçu le 4 février 2002

RÉSUMÉ

Les maladies de Gaucher et de Fabry sont des maladies lysosomales qui appartiennent toutes les deux au sous-groupe des sphingolipidoses. Cependant, ces maladies présentent d'importantes différences à la fois biologiques et cliniques. La maladie de Gaucher est due à un déficit en glucocérébrosidase, une enzyme membranaire, alors que la maladie de Fabry est en rapport avec un déficit en une enzyme lysosomale soluble, l' α -galactosidase. Des stratégies de thérapie génique de type sécrétion/recapture sont donc indiquées dans le cas de la maladie de Fabry alors que la thérapie génique de la maladie de Gaucher impose de cibler les tissus les plus atteints. Dans la forme non neurologique de maladie de Gaucher (type 1), les recherches de thérapie génique se sont orientées vers la transduction du gène GC dans le tissu hématopoïétique étant donné l'accumulation préférentielle du substrat dans les macrophages. Des essais cliniques avec des rétrovirus ont même été effectués mais leurs

résultats sont mitigés notamment du fait des limitations des vecteurs rétroviraux utilisés. Le développement de vecteurs lentiviraux ouvre ici de nouvelles perspectives. Les lésions neurologiques des maladies lysosomales impliquant des enzymes solubles semblent à présent aussi abordables à l'aide de nouveaux vecteurs de type lentivirus ou AAV ; les maladies de Gaucher de type 2 et 3 pourraient cependant présenter des difficultés particulières en raison du caractère non soluble de la glucocérébrosidase. Dans le cas de la maladie de Fabry, les recherches actuelles, qui visent à créer *in vivo* une source importante et disséminée de production d'enzyme, ont permis d'obtenir de bons résultats expérimentaux chez la Souris Fabry. Au total, la place qu'occupera la thérapie génique dans le traitement des maladies de Gaucher et de Fabry dépendra à la fois de ses propres performances et de celles des autres approches thérapeutiques, en particulier de l'enzymothérapie.

SUMMARY Gene therapy for Gaucher disease and Fabry disease: a 2002 update

Gaucher disease and Fabry disease are lysosomal storage disorders characterized by the accumulation of sphingolipids. In both cases, the goal of gene therapy is to permanently provide tissues with enzyme levels allowing to avoid storage of the undigested substrates. Different gene therapy strategies must however be designed as Gaucher disease is due to a deficiency in the membrane-associated enzyme glucocerebrosidase, whereas Fabry disease is caused by a deficiency in the soluble enzyme α -galactosidase. Indeed, a soluble enzyme can be provided to tissues *in trans* by gene-modified cells whereas gene transfer has to target the most affected cells in the case of membrane-bound enzymes. Thus, in non-neurological Gaucher disease (type 1), the hematopoietic tissue has to be targeted as the deficiency affects the monocyte/macrophage lineage. Following promising preclinical studies, clinical protocols have been initiated to explore the feasi-

bility and safety of retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with type 1 Gaucher disease. Although gene-marked cells were detected *in vivo*, the level of corrected cells was very low, a finding indicating that improved vectors along with partial myeloablation may be necessary. Here, lentiviral vectors should enable more gene transduction into the hematopoietic target cells. As concerns the diffuse neurological lesions in types 2 and 3 of Gaucher disease, they will probably be especially difficult to target by gene therapy because of the non soluble nature of glucocerebrosidase. Finally, over the last few years, Fabry disease has become a compelling target for gene therapy as an etiology-based treatment strategy. Indeed, several recent studies aiming at creating a large *in vivo* source of α -galactosidase have yielded positive long-term results in the Fabry knock-out mouse model.

INTRODUCTION

Les lysosomes sont le siège principal du catabolisme cellulaire. En effet, les enzymes lysosomales sont impliquées dans la dégradation de la plupart des macromolécules complexes intracellulaires (glycolipides, glycosaminoglycane, glycoprotéines...). Les maladies lysosomales, qui résultent de déficits enzymatiques spécifiques, forment donc un vaste ensemble hétérogène de maladies caractérisées par l'accumulation intracellulaire des divers substrats non dégradés (Neufeld, 1991 ; Gieselmann, 1995). Considérées dans leur ensemble, les maladies lysosomales sont relativement fréquentes (fréquence de 1/5000 à 1/10000) alors que chacune d'elles est plutôt rare. Ces maladies de surcharge peuvent être classées selon la voie métabolique où intervient l'enzyme déficitaire et donc selon la nature des substrats non dégradés accumulés dans les cellules. Les principaux groupes formés par les plus de 50 maladies lysosomales décrites à ce jour sont ainsi les lipidoses, les mucopolysaccharidoses et les glycoprotéinoses, qui sont caractérisées respectivement par l'accumulation de sphingolipides, de glycosaminoglycane et de glycoprotéines. L'hétérogénéité des maladies lysosomales est d'autant plus grande que le déficit enzymatique peut être de degré variable. En clinique humaine, on rencontre ainsi des formes sévères se manifestant dès la petite enfance qui sont dues à un déficit enzymatique complet et des formes tardives de l'adulte où il y a persistance d'une faible activité enzymatique résiduelle.

Les maladies de Gaucher et de Fabry sont des maladies lysosomales du groupe des sphingolipidoses. La maladie de Gaucher est due à un déficit en glucocérébrosidase (GC) qui normalement catalyse la dégradation de glucosylcéramide en glucose et céramide, alors que la maladie de Fabry est due à un déficit en α -galactosidase (α -Gal) qui intervient dans l'hydrolyse de globotriaosylcéramide en lactosylcéramide (Neufeld, 1991). Les deux maladies sont donc caractérisées par l'accumulation de sphingolipides, à savoir de glucocérébroside dans le Gaucher et de sphingolipides neutres dans le Fabry. Cependant, ces deux maladies lysosomales présentent d'importantes différences biologiques et cliniques qui doivent impérativement être prises en compte lorsqu'on envisage leur traitement par thérapie génique (Salveti *et al.*, 1995). Sur le plan biologique, l' α -galactosidase en cause dans la maladie de Fabry fait partie des enzymes lysosomales dont l'adressage au lysosome fait intervenir le récepteur au mannose-6-phosphate (man-6-P). Ces enzymes sont dites « solubles » car elles sont partiellement excrétées dans le milieu extracellulaire, d'où elles peuvent être réinternalisées par des cellules se trouvant à distance grâce à des récepteurs au man-6-P situés sur leur membrane plasmique. L'existence d'un tel mécanisme de sécrétion/recapture permet donc d'envisager une correction croisée à distance dans le cas des maladies lysosomales impliquant des enzymes solubles. A la différence de l' α -Gal, la GC en cause dans la maladie de Gaucher n'est pas une enzyme soluble, son adressage lysosomal ne faisant pas intervenir la voie du mannose-

6-phosphate. La GC est en effet une enzyme dite « associée à la membrane » dont le routage au lysosome est encore mal connu. Les maladies de Gaucher et de Fabry sont également très différentes sur le plan clinique (Neufeld, 1991, Gieselmann, 1995). La symptomatologie de la forme non neurologique de la maladie de Gaucher (Gaucher de type 1) est en rapport avec l'accumulation préférentielle de glucocérébroside non dégradé dans les lysosomes des macrophages du système réticuloendothélial (SRE); il s'agit donc schématiquement d'une maladie de surcharge du tissu hématopoïétique avec des organomégalies (foie, rate) et des signes hématologiques et osseux. A la différence du type 1, les types 2 et 3 de maladie de Gaucher comportent une atteinte neurologique majeure qui se révèle soit durant les premiers mois de vie (type 2), soit durant l'enfance (type 3). En ce qui concerne la maladie de Fabry, sa symptomatologie clinique est principalement liée au dépôt de glycosphingolipides non dégradés dans l'endothélium vasculaire avec survenue secondaire d'atteintes cardiaques, nerveuses et surtout rénales. C'est l'atteinte rénale qui est la cause de décès dans la maladie de Fabry. De façon schématique, la maladie de Fabry peut donc être considérée comme une maladie multiviscérale, sans atteinte neurologique primaire, dont le pronostic concerne le rein. Au total, les maladies de Gaucher et de Fabry sont donc des sphingolipidoses présentant des particularités fort différentes à prendre en considération pour la mise au point de stratégies de thérapie génique.

1. Particularités favorables et défavorables des maladies lysosomales pour la thérapie génique

Les maladies lysosomales présentent dans leur ensemble des particularités pour la thérapie génique qu'il est judicieux de rappeler ici avant de discuter plus spécifiquement les perspectives de thérapie génique pour les maladies de Gaucher et de Fabry.

Les maladies lysosomales sont généralement considérées comme de bonnes candidates pour la thérapie génique (Salveti *et al.*, 1995 ; Poenaru, 1996a ; Poenaru, 1996b ; Caillaud & Poenaru, 2000 ; Yew & Cheng, 2001 ; Barranger & Novelli, 2001). Tout d'abord, les gènes en cause (voire les mutations chez les patients) sont connus et les ADNc ont été clonés et sont habituellement de petite taille, ce qui permet leur inclusion dans la totalité des vecteurs de thérapie génique. Ensuite, la nature ubiquitaire des enzymes lysosomales entraîne qu'un ciblage étroit n'est pas nécessaire lors du transfert de gènes. La prédilection tissulaire de l'accumulation des substrats non dégradés permet par ailleurs de définir des tissus ou organes cibles qui sont donc des cibles « larges ». De plus, une expression faible et non finement régulée du transgène devrait être satisfaisante vu qu'il s'agit d'enzymes « de ménage » dont une faible activité est compatible avec une vie normale comme cela est attesté par l'existence de formes atténuées et de pseudodéficits. Enfin des modèles animaux ont été développés pour bon nombre de maladies lysosomales et permettent donc de tester les divers types de vecteurs et de stratégies de thé-

rapie génique, notamment des stratégies de sécrétion/recapture dans le cas des enzymes solubles.

Les maladies lysosomales dans leur ensemble présentent cependant aussi un certain nombre d'obstacles pour la thérapie génique. En effet, comme pour toutes les maladies génétiques, une efficacité à long terme est souhaitable, ce qui nécessite une expression stable du transgène. C'est surtout l'atteinte neurologique primaire rencontrée dans beaucoup de maladies lysosomales qui pose des problèmes difficiles et particuliers pour la thérapie génique (Poenaru, 2001). En effet, en raison de l'existence de la barrière hémato-méningée, une atteinte primaire du système nerveux central (SNC) va sans doute demander la mise en œuvre d'une stratégie particulière à visée cérébrale afin de produire l'enzyme manquante dans le cerveau même. Ceci impose d'ailleurs le recours à une approche combinée quand il y a la fois une atteinte viscérale et une atteinte neurologique primaire (Poenaru, 2001). Il faut aussi noter ici qu'une atteinte neurologique peut exiger un traitement précoce avant la formation de lésions irréversibles et que le caractère diffus des lésions neurologiques des maladies lysosomales est responsable de difficultés supplémentaires, notamment dans le cas des enzymes non sécrétées. Par ailleurs, une atteinte multiviscérale pourrait elle aussi demander le recours à une stratégie combinée associant cette fois-ci une approche viscérale globale (de type sécrétion de l'enzyme) et le ciblage du transfert de gènes au niveau d'un organe ou tissu particulièrement lésé ou difficilement accessible par voie sanguine (os, cartilage) (Yew & Cheng, 2001). Enfin, l'administration d'un vecteur (notamment viral) de thérapie génique directement *in vivo* expose à une réponse immunitaire contre ce vecteur et l'expression du transgène peut entraîner une réponse immunitaire dirigée contre l'enzyme produite, en particulier dans les formes les plus sévères avec absence complète de protéine enzymatique.

2. Stratégies de thérapie génique pour les maladies lysosomales : cas particuliers des maladies de Gaucher et de Fabry

Les recherches de thérapie génique ont permis le développement de divers types de vecteurs qu'il faut cependant utiliser dans des stratégies adéquates pour le traitement des maladies cibles. Dans le cas des maladies lysosomales, la stratégie de thérapie génique est fonction tout d'abord du type d'enzyme en cause (Salveti *et al.*, 1995). En effet, pour les enzymes solubles, une approche de type sécrétion/recapture avec ses avantages évidents est envisageable. Divers tissus peuvent ici servir de source de production de l'enzyme : fibroblastes (en particulier dans le cadre d'une stratégie organoïdes), foie, muscle... Au contraire, dans le cas des enzymes non solubles, un ciblage des organes critiques s'impose. Enfin, l'existence d'une atteinte neurologique primaire va vraisemblablement demander la mise en œuvre d'une approche particulière visant le SNC qui peut faire appel soit à une stratégie directe (administration du vecteur *in vivo*) soit à une stratégie indirecte (par l'intermédiaire de

cellules transduites *ex vivo*) (Poenaru, 2001). Toutes ces considérations mettent clairement en évidence l'importance que prendront sans doute dans le futur les approches combinées, notamment maintenant que de premiers résultats positifs ont été obtenus au niveau cérébral dans des modèles animaux de maladies lysosomales comme la mucopolysaccharidose VII (MPS VII).

La maladie de Gaucher présente clairement un certain nombre de points particuliers à prendre en considération ici. Tout d'abord, l'enzyme en cause, la GC, est une enzyme membranaire, non soluble ; il en découle qu'une stratégie de type sécrétion/recapture semble d'emblée peu prometteuse. Ensuite, en ce qui concerne la maladie de Gaucher de type 1 : 1) le substrat non dégradé s'accumule dans les macrophages du SRE, ce qui fait du tissu hématopoïétique le tissu cible privilégié pour le transfert de gènes ; 2) la greffe de moelle osseuse allogénique est efficace et, par conséquent, une transduction satisfaisante du tissu hématopoïétique devrait également être efficace ; 3) l'enzymothérapie substitutive est elle aussi cliniquement efficace (mais elle utilise une enzyme modifiée dans le but de pouvoir être captée par les macrophages) ; 4) la correction à long terme des cellules du tissu hématopoïétique par thérapie génique aurait ici l'avantage d'éviter les inconvénients et risques de la greffe de moelle osseuse allogénique (besoin de recourir à un donneur HLA-compatible et risque de maladie du greffon contre l'hôte GvH) et de l'enzymothérapie (répétition des administrations et donc coût forcément élevé). Quant aux types 2 et 3 de la maladie de Gaucher, qui comportent une atteinte primaire du SNC, ils nécessiteront sans doute le recours à une stratégie de ciblage du SNC d'autant plus délicate que l'atteinte est diffuse et que la GC est une enzyme associée à la membrane, non soluble. Dans ce contexte, il faut cependant aussi se poser la question de l'efficacité thérapeutique éventuelle de macrophages cérébraux « épurateurs » générés par la transduction du tissu hématopoïétique étant donné que des macrophages cérébraux dérivant du donneur ont été observés après greffe de moelle osseuse allogénique et que certaines observations d'effets bénéfiques de l'enzymothérapie sur l'atteinte neurologique pourraient être en rapport avec la migration de macrophages « chargés » (Salveti *et al.*, 1995 ; Poenaru, 1996b ; Yew and Cheng, 2001). Enfin, divers modèles murins de la maladie de Gaucher (de type 2 et 3) ont été développés, mais ils sont peu adéquats pour les études expérimentales vu que les animaux décèdent durant les premiers jours de vie (Tybulewicz *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 1998).

Comme déjà indiqué plus haut, la maladie de Fabry, qui est due à un déficit en α -Gal soluble, peut schématiquement être considérée comme une maladie multiviscérale d'origine endothéliale, sans atteinte neurologique primaire, dont le pronostic est rénal. Il en découle qu'une stratégie de thérapie génique de type sécrétion/recapture semble particulièrement indiquée. Un transfert de gènes limité au seul rein risque en effet de ne pas être suffisant vu que des reins greffés ont à nouveau été le siège de lésions (Poenaru, 1996a). La création d'une véritable « usine de production enzymatique » de taille impor-



tante et suffisante (par exemple, disséminée dans l'organisme) semble donc requise ici. Les recherches actuelles de thérapie génique visent ainsi à tester l'efficacité de telles stratégies de production enzymatique dans un modèle souris obtenu par invalidation génique (Ohshima *et al.*, 1997). Il n'est cependant pas exclu qu'une telle approche « généralisée » doive s'accompagner d'une stratégie ciblant le rein. Enfin, comme dans le cas de la maladie de Gaucher, un traitement par thérapie génique de la maladie de Fabry aurait l'intérêt d'éviter les inconvénients des autres modalités thérapeutiques, à savoir les problèmes de la greffe rénale et la nécessité de réadministrations particulièrement fréquentes (vu la durée de vie très courte de l'enzyme) lors de l'enzymothérapie α -Gal (Brady & Schiffmann, 2000; Siatskas & Medin, 2001).

3. Thérapie génique de la maladie de Gaucher de type 1 : études précliniques initiales et premiers essais cliniques

Le tissu hématopoïétique constitue très clairement le tissu cible pour le transfert de gènes dans les formes non neurologiques de maladie de Gaucher (type 1). Les études précliniques de thérapie génique se sont donc d'emblée focalisées sur la transduction de ce tissu. Les vecteurs dérivés des oncorétrovirus murins apparaissaient comme des vecteurs particulièrement bien adaptés car le tissu hématopoïétique est un tissu complexe et hiérarchisé, caractérisé par l'existence de très nombreuses divisions cellulaires lors de la différenciation des cellules souches (CSH) en cellules différenciées (comme les macrophages). Les rétrovirus ont en effet la capacité d'intégrer efficacement leur matériel génétique dans le génome des cellules qu'ils infectent en y créant un provirus stable, ce qui fait que la modification génétique va pouvoir persister et être transmise aux cellules filles issues des CSH transduites. De plus, la transduction des réelles CSH devrait permettre une modification génétique à long terme. De nombreux travaux *in vitro* ont ainsi montré que des vecteurs rétroviraux permettaient de transduire efficacement l'ADNc de la GC humaine dans des progéniteurs murins et dans des cellules immatures CD34⁺ humaines (normales et de patients Gaucher) purifiées à partir de diverses sources (moelle osseuse, cordon ombilical, sang périphérique) (Nolta *et al.*, 1992; Bahnson *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994; Barranger *et al.*, 1997). Il a aussi été noté que l'efficacité de transduction des progéniteurs était augmentée lorsque la transduction était effectuée en présence de stroma autologue et de facteurs de croissance (IL-3, IL-6 et SCF) (Xu *et al.*, 1995). Divers autres travaux ont consisté en de « classiques » expériences de reconstitution hématologique de souris normales (irradiées) à l'aide de moelle osseuse transduite par des rétrovirus transportant le gène GC humain (Nimgaonkar *et al.*, 1995; Krall *et al.*, 1996). Globalement, ces travaux ont montré que le tissu hématopoïétique de la souris receveuse était repeuplé (en partie importante) par des cellules transduites et que celles-ci exprimaient le gène GC à long terme (plusieurs mois)

après la greffe. Il est à noter que, dans le cerveau, une proportion significative (20 %) des cellules macrophagiques ont été trouvées être dérivées du greffon et exprimaient la GC (Krall *et al.*, 1994). Un travail a aussi montré que la greffe de cellules transduites restait possible en l'absence de traitement myélosuppresseur (irradiation) de la souris receveuse, ce qui suggérait qu'une telle stratégie moins agressive méritait d'être testée chez l'homme (Schiffmann *et al.*, 1995).

L'ensemble des travaux expérimentaux précédents ont amené le comité américain RAC (Recombinant DNA Advisory Committee), qui supervise les protocoles cliniques de thérapie génique aux États-Unis, à donner son accord pour des essais cliniques de thérapie génique chez des patients atteints de maladie de Gaucher de type 1. Ces protocoles cliniques sont présentés de façon synthétique dans la base de données interactives « Clinical trials » du site internet du Journal of Gene Medicine (www.wiley.co.uk/genmed) et ont par ailleurs aussi été publiés (Dunbar & Kohn, 1996; Schuening *et al.*, 1997). Schématiquement, ces protocoles cliniques ont consisté à utiliser des rétrovirus recombinants transportant le gène GC (sous le contrôle du LTR rétroviral) pour la transduction de cellules CD34⁺ purifiées à partir de moelle osseuse ou du sang périphérique (après mobilisation par G-CSF). Les patients n'ont pas reçu de traitement myélosuppresseur préalablement à l'injection des cellules transduites car il ne semblait pas éthique de les exposer à un traitement aussi agressif alors qu'existe une enzymothérapie efficace. Le but de ces essais était donc d'évaluer l'efficacité de transduction de cellules CD34⁺ Gaucher, la durée et le niveau d'expression du transgène GC et la toxicité des procédés employés. Le groupe du NIH a publié les résultats de son essai qui peuvent se résumer de la façon suivante : (1) la greffe de cellules CD34⁺ Gaucher transduites à l'aide de rétrovirus est possible ; (2) mais très peu de cellules marquées sont retrouvées *in vivo* dans le sang et la moelle osseuse (< 0,02 %) et ceci de façon très transitoire ; (3) l'activité GC des patients n'a donc pas été augmentée et aucun effet clinique n'a pu être observé (Dunbar *et al.*, 1998). Ces résultats plutôt négatifs ont cependant permis de mettre l'accent sur le rôle négatif vraisemblable de l'absence de toute myélosuppression et sur les limitations des vecteurs rétroviraux employés.

4. Thérapie génique de la maladie de Gaucher : perspectives actuelles

Le récent développement de vecteurs lentiviraux ouvre très clairement de nouvelles perspectives pour la thérapie génique des formes non neurologiques (type 1) de la maladie de Gaucher car ces vecteurs semblent plus efficaces que les rétrovirus murins pour la transduction des CSH. En effet, les lentivirus ont principalement la capacité de transduire efficacement des cellules quiescentes (comme les CSH). De plus, les vecteurs lentiviraux semblent moins sujet que les rétrovirus murins à l'inactivation transcriptionnelle et leur expression semble aussi moins dépendante du site d'intégration (Vigna & Naldini,

2000). De très nombreuses études expérimentales récentes se sont donc focalisées sur l'utilisation de lentivirus pour la transduction du tissu hématopoïétique. Elles ont globalement démontré la supériorité des vecteurs lentiviraux pour la transduction (en l'absence de facteurs de croissance) de progéniteurs humains multipotents et lors d'expériences de reconstitution hématologique de souris NOD/SCID avec des cellules CD34⁺ humaines ou de singes rhésus avec des CD34⁺ autologues (Uchida *et al.*, 1998; Case *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 1999; Miyoshi *et al.*, 1999; An *et al.*, 2000). Si les lentivirus semblent très prometteurs, ils n'ont cependant pas encore été utilisés jusqu'à présent en clinique humaine en raison d'évidentes questions de sécurité d'emploi; il y a d'ailleurs un intense débat entre les tenants des vecteurs dérivés du VIH et ceux des vecteurs dérivés de lentivirus non-primates comme le FIV (feline immunodeficiency virus), le CAEV (caprine arthritisme/encephalite virus), l'EIAV (equine infectieuse anémie virus) voire le virus bovin Jembrana (Kingsman, 1999; Trono, 2000; Vigna & Naldini, 2000; Metharom *et al.*, 2000).

En ce qui concerne les perspectives de thérapie génique des formes neurologiques de maladie de Gaucher (types 2 et 3), le fait marquant récent est très clairement l'obtention par thérapie génique d'effets positifs spectaculaires sur les lésions neurologiques chez des souris modèles de la mucopolysaccharidose de type VII (MPS VII ou maladie de Sly). Ainsi, l'administration intracérébrale de vecteurs lentiviraux ou de vecteurs AAV transportant le gène β -glucuronidase en cause dans la MPS VII s'est révélée être capable de corriger les lésions neurologiques des animaux, avec détection de l'activité enzymatique et diminution (voire disparition) des anomalies de stockage dans des zones étendues du cerveau (Elliger *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2000a; Bosch *et al.*, 2000b). Il faut cependant noter ici que ces résultats spectaculaires ont été obtenus dans le cas d'une enzyme lysosomale soluble et qu'ils ne peuvent donc vraisemblablement pas être directement transposés dans le cas des atteintes neurologiques des types 2 et 3 de la maladie de Gaucher vu le caractère membranaire, non soluble de la GC.

5. Thérapie génique de la maladie de Fabry : perspectives actuelles

En accord avec les particularités de la maladie de Fabry (voir plus haut), les stratégies de thérapie génique actuellement à l'étude visent toutes à créer *in vivo* une source importante et disséminée de production d' α -Gal. Ces stratégies peuvent d'ailleurs être étudiées chez des souris modèles (souris Fabry) obtenues par invalidation génique, qui présentent les signes biologiques de la maladie humaine (Ohshima *et al.*, 1997). Des adénovirus et des AAV α -Gal ont ainsi été administrés directement *in vivo*. Après injection intraveineuse d'un adénovirus α -Gal chez la Souris Fabry, de l'activité enzymatique α -Gal a été détectée dans tous les tissus (foie, rein, cœur, poumon...) de façon transitoire (10 % d'activité persistant à 12 semaines) avec une quasi-disparition de l'accumula-

tion des sphingolipides durant une période de 6 mois (Ziegler *et al.*, 1999). L'utilisation d'adénovirus directement *in vivo* se heurte cependant aux problèmes de la toxicité du vecteur et de la nécessité de réadministrations. L'utilisation de vecteurs AAV *in vivo* a aussi été étudiée car il s'agit de vecteurs peu toxiques, peu immunogènes qui permettent un transfert de gènes stable (Snyder, 1999). Ainsi, chez la Souris Fabry, un AAV α -Gal injecté dans la veine porte a permis un niveau d'expression satisfaisant du transgène (30 % de la normale) dans tous les tissus durant 6 mois avec diminution persistante du stockage des sphingolipides (Jung *et al.*, 2001). D'autres recherches récentes ont testé l'efficacité d'une stratégie « indirecte » impliquant la réimplantation de cellules corrigées *ex vivo*. Ainsi, de la moelle osseuse de souris Fabry a été transduite à l'aide de rétrovirus α -Gal et puis utilisée pour la reconstitution hématologique de receveuses Fabry irradiées (Takanaka *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2001). De l'activité α -Gal accompagnée d'une diminution de l'intensité de stockage des sphingolipides a été détectée au niveau de tous les tissus à l'exception du cerveau. Le tissu hématopoïétique sert ici de source disséminée de production d' α -Gal. Par ailleurs, des rétrovirus ont été utilisés pour transduire *in vitro* le gène α -Gal dans des cellules hématopoïétiques humaines normales et de patients atteints de maladie de Fabry (Takanaka *et al.*, 1999; Takiyama *et al.*, 1999). Comme dans le cas du Gaucher de type I, les lentivirus devraient être particulièrement indiqués pour cette approche impliquant le tissu hématopoïétique et il se pose évidemment aussi la question de la myélosuppression. En conclusion, diverses stratégies de thérapie génique sont donc actuellement explorées dans le cadre de la maladie de Fabry vu que la thérapie génique aurait l'avantage, par rapport à l'enzymothérapie, de permettre un traitement à long terme.

CONCLUSIONS

Les maladies lysosomales semblaient initialement de bonnes candidates pour la thérapie génique, en particulier la maladie de Gaucher de type I qui paraissait accessible par transduction du tissu hématopoïétique à l'aide de rétrovirus. Cependant, les résultats des premiers essais cliniques dans le type I de la maladie de Gaucher ont été mitigés, en particulier du fait des limitations des vecteurs rétroviraux utilisés. Par ailleurs, le développement d'un traitement efficace par enzymothérapie a rendu encore plus incertaine la place éventuelle de la thérapie génique dans le cadre des maladies de Gaucher et de Fabry. Cependant, la mise au point récente de nouveaux vecteurs plus efficaces et plus adaptés (lentivirus, AAV) permet à présent d'envisager à nouveau un futur pour la thérapie génique des maladies de Gaucher et de Fabry.

BIBLIOGRAPHIE

An D. S., Wersto R. P., Agricola B. A., Metzger M. E., Lu S., Amado R. G., Chen I. S. & Donahue R. E., Marking and

- gene expression by a lentivirus vector in transplanted human and nonhuman primate CD34(+) cells. *J. Virol.*, 2000, 74, 1286-1295.
- Bahnon A. B., Nimgaonkar M., Fei Y., Boggs S. S., Robbins P. D., Ohashi T., Dunigan J., Li J., Ball E. D. & Barranger J. A., Transduction of CD34+ enriched cord blood and Gaucher bone marrow cells by a retroviral vector carrying the glucocerebrosidase gene. *Gene Ther.*, 1994, 1, 176-184.
- Barranger J. A., Rice E. O., Dunigan J., Sansieri C., Takiyama N., Beeler M., Lancia J., Lucot S., Scheirer-Fochler S., Mohny T., Swancy W., Bahnon A. & Ball E. Gaucher's disease : studies of gene transfer to haematopoietic cells. *Baillieres Clin. Hematol.*, 1997, 10, 765-778.
- Barranger J. A. & Novelli E. A., Gene therapy for lysosomal storage disorders. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2001, 1, 857-867.
- Bosch A., Perret E., Desmaris N. & Heard J. M., Long-term and significant correction of brain lesions in adult mucopolysaccharidosis type VII mice using recombinant AAV vectors. *Mol. Ther.*, 2000a, 1, 63-70.
- Bosch A., Perret E., Desmaris N., Trono D. & Heard J. M., Reversal of pathology in the entire brain of mucopolysaccharidosis type VII mice after lentivirus-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.*, 2000b, 11, 1139-1150.
- Brady R. O. & Schiffmann R., Clinical features of and recent advances in therapy for Fabry disease. *JAMA*, 2000, 284, 2771-2775.
- Caillaud C. & Poenaru L., Gene therapy in lysosomal diseases. *Biomed. & Pharmacother.* 2000, 54, 505-512.
- Case S. S., Price M. A., Jordan C.T., Yu X. J., Wang L., Bauer G., Haas D. L., Xu D., Striebeck R., Naldini L., Kohn D. B. & Crooks G. M., Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1 based lentiviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 2988-2993.
- Dunbar C. & Kohn D., Retroviral mediated transfer of the cDNA for human glucocerebrosidase into hematopoietic stem cells of patients with Gaucher disease: a phase I study. *Hum. Gene Ther.*, 1996, 7, 231-253.
- Dunbar C. E., Kohn D. B., Schiffmann R., Barton N. W., Nolte J. A., Esplin J. A., Pensiero M., Long Z., Lockey C., Emmons R. V. B., Csik S., Leitman S., Krebs C. B., Carter C., Brady R. O. & Karlsson S., Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: *in vivo* detection of transduced cells without myeloablation. *Hum. Gene Ther.*, 1998, 9, 2629-2640.
- Elliger S. S., Elliger C. A., Aguilar C. P., Raju N. R. & Watson G. L., Elimination of lysosomal storage in brains of MPS VII mice treated by intrathecal administration of an adeno-associated virus vector. *Gene Ther.*, 1999, 6, 1175-1178.
- Evans J. T., Kelly P. F., O'Neill E., Garcia J. V., Human cord blood CD34(+)CD38(-) cell transduction via lentivirus based gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.*, 1999, 10, 1479-1489.
- Gieselmann V., Lysosomal storage diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1270, 103-136.
- Jung S. C., Han I. P., Limaye A., Xu R., Gelderman M. P., Zervas P., Tirumalai K., Murray G. J., Doring M. J., Brady R. O. & Qasba P., Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer results in long-term enzymatic and functional correction in multiple organs of Fabry mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 2676-2681.
- Kingsman A., Non-HIV lentiviral vectors. *J. Gene Med.*, 1999, 1, 441-443.
- Krall W. J., Challita P. M., Perlmutter L. S., Skelton D. C. & Kohn D. B., Cells expressing human glucocerebrosidase from a retroviral vector repopulate macrophages and central nervous system microglia after murine bone marrow transplantation. *Blood*, 1994, 83, 2737-2748.
- Krall W. J., Skelton D. C., Yu X. J., Riviere I., Lehn P., Mulligan R. C. & Kohn D. B., Increased levels of spliced RNA account for augmented expression from the MFG retroviral vector in hematopoietic cells. *Gene Ther.* 1996, 3, 37-48.
- Liu Y., Suzuki K., Reed J. D., Grinberg A., Westphal H., Hoffmann A., Döring T., Sandhoff K. & Proia R. L., Mice with type 2 and 3 Gaucher disease point mutations generated by a single insertion mutagenesis procedure (SIMP). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 2503-2508.
- Metharom P., Takyar S., Xia H. H., Ellem K. A. O., Macmillan J., Shepherd R. W., Wilcox G. E. & Wei M. Q., Novel bovine lentiviral vectors based on Jembrana disease virus. *J. Gene Med.*, 2000, 2, 176-185.
- Miyoshi H., Smith K. A., Mosier D. E., Verma I. M. & Torbett B. E., Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 1999, 283, 682-686.
- Neufeld E. F., Lysosomal storage diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 1991, 60, 257-280.
- Nimgaonkar M., Bahnon A., Kemp A., Lancia J., Mannion-Henderson J., Boggs S., Mohny T., Dunigan J. & Barranger J. A., Long-term expression of the glucocerebrosidase gene in mouse and human hematopoietic progenitors. *Leukemia* 1995, 9, suppl. 1, S38-42.
- Nolta J. A., Yu X. J., Bahner I. & Kohn D. B., Retroviral-mediated transfer of the human glucocerebrosidase gene into cultured Gaucher bone marrow. *J. Clin. Invest.* 1992, 90, 342-348.
- Ohshima T., Murray G. J., Swaim W. D., Longenecker G., Quirk J. M., Cardarelli C. O., Sugimoto Y., Gottesman M. M., Brady R. O. & Kulkarni A. B., α -Galactosidase A deficient mice : a model of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 2540-2544.
- Poenaru L., Particularities of lysosomal storage diseases gene therapy. *Gene Ther.* 1996a, 3, 1039-1041.
- Poenaru L., Thérapie génique des maladies lysosomales. *Médecine/Sciences* 1996b, 12, 35-46.
- Poenaru L., From gene transfer to gene therapy in lysosomal storage diseases affecting the central nervous system. *Ann. Med.* 2001, 33, 28-36.
- Qin G., Takenaka T., Telsch K., Kelley L., Howard T., Levade T., Deans R., Howard B. H., Malech H. L., Brady R. O. & Medin J. A., Preselective gene therapy for Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 3428-3433.
- Salveti A., Heard J. M. & Danos O., Gene therapy of lysosomal storage disorders. *British Med. Bull.* 1995, 51, 106-122.
- Schiffmann R., Medin J. A., Ward J. M., Stahl S., Cottler-Fox M. & Karlsson S., Transfer of the human glucocerebrosidase gene into hematopoietic stem cells of nonablated recipients : successful engraftment and long-term expression of the transgene. *Blood* 1995, 86, 1218-1227.
- Schuening F., Longo W. L., Atkinson M. E., Zaboikin M., Kiem H. P., Sanders J., Scott C. R., Storb R., Miller A. D., Reynolds T., Bensinger W., Rowley S., Gooley T., Darovsky B. & Appelbaum F., Retrovirus-mediated transfer of the cDNA for human glucocerebrosidase into peripheral blood repopulating cells of patients with Gaucher's disease. *Hum. Gene Ther.* 1997, 8, 2143-2160.
- Siatskas C. & Medin J. A., Gene therapy for Fabry disease. *J. Inher. Metab. Dis.*, 2001, 24, suppl. 2, 25-41.
- Snyder R. O., Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *J. Gene Med.*, 1999, 1, 166-175.
- Takanaka T., Hendrickson C. S., Tworck D. M., Tudor M., Schiffmann R., Brady R. O. & Medin J. A., Enzymatic and functional correction along with long-term enzyme secretion from transduced bone marrow hematopoietic stem/progenitor and stromal cells derived from patients with Fabry disease. *Exp. Hematol.* 1999, 27, 1149-1159.
- Takanaka T., Murray G. J., Qin G., Quirk J. M., Ohshima T.,

- Qasba P., Clark K., Kulkarni A. B., Brady R. O. & Medin J. A., Long-term enzyme correction and lipid reduction in multiple organs of primary and secondary transplanted Fabry mice receiving transduced bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 7515-7520.
- Takiyama N., Dunigan J. T., Vallor M. J., Kase R., Sakuraba H. & Barranger J. A., Retrovirus-mediated transfer of human alpha-galactosidase A gene to human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Hum. Gene Ther.*, 1999, 10, 2881-2889.
- Trono D., HIV-based vectors : getting the best out of the worst. *J. Gene Med.*, 2000, 2, 61-63.
- Tybulewicz V. L., Tremblay M. L., LaMarca M. E., Willemsen R., Stubblefield B. K., Winfield S., Zablocka B., Sidransky E., Martin B. M., Huang S. P., Mintzer K. A., Westphal H., Mulligan R. C. & Ginns E. I., Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. *Nature*, 1992, 357, 407-410.
- Uchida N., Sutton R. E., Frieria A. M., He D., Reitsma M. J., Chang W. C., Veres G., Scollay R. & Weissman I. L. HIV, but not murine leukaemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 11939-11944.
- Vigna E & Naldini L. Lentiviral vectors : excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J. Gene Med.* 2000, 2, 308-316.
- Xu L., Stahl S. K., Dave H. P., Schiffmann R., Correll P. H., Kessler S. & Karlsson S., Correction of the enzyme deficiency in hematopoietic cells of Gaucher patients using a clinical acceptable retroviral supernatant transduction protocol. *Exp. Hematol.*, 1994, 22, 223-230.
- Xu L. C., Kluepfel-Stahl S., Blanco M., Schiffmann R., Dunbar C. & Karlsson S., Growth factors and stromal support generate very efficient retroviral transduction of peripheral blood CD34+ cells from Gaucher patients. *Blood*, 1995, 86, 141-146.
- Yew N. S. & Cheng S. H., Gene therapy for lysosomal storage disorders. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2001, 3, 399-406.
- Ziegler R. J., Yew N. S., Li C., Cherry M., Berthelette P., Romanczuk H., Ioannou Y. A., Zeidner K. M., Desnick R. J. & Cheng S. H., Correction of enzymatic and lysosomal storage defects in Fabry mice by adenovirus-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.*, 1999, 10, 1667-1682.