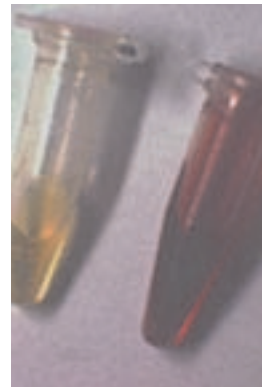


> Les porphyries héréditaires représentent un ensemble de maladies métaboliques caractérisées par une synthèse, une accumulation et une excrétion accrues de porphyrines et/ou de leurs précurseurs, l'acide delta aminolévulinique et le porphobilinogène. Chacune de ces maladies a pu être reliée à un déficit spécifique d'une des enzymes de la biosynthèse de l'hème, et nous avons précédemment publié dans *Médecine/Sciences* les progrès effectués dans la connaissance des gènes, la pathologie moléculaire des porphyries ainsi que des modèles animaux indispensables pour des études physiopathologiques et thérapeutiques. Parmi les porphyries érythropoïétiques, la porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC), ou maladie de Günther, la plus sévère des porphyries, est une maladie génétique caractérisée par un déficit en uroporphyrinogène III synthase (UROS). Elle est actuellement traitée par greffe de moelle osseuse allogénique dans les formes graves ; elle pourrait bénéficier dans le futur d'une thérapie génique ciblée sur les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques. Les résultats d'une thérapie génique efficace dans un nouveau modèle murin de cette porphyrie sont exposés dans cet article. <

Succès de la thérapie génique d'un modèle murin de porphyrie érythropoïétique congénitale

Hubert de Verneuil, Elodie Robert-Richard, Cécile Ged, Frédéric Mazurier, Emmanuel Richard, François Moreau-Gaudry



Inserm, U876, Université Victor Segalen-Bordeaux 2, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. verneuil@u-bordeaux2.fr

sentent une excrétion massive de porphyrines dans les urines (majoritairement l'uroporphyrine I) et les selles. L'anémie hémolytique est due à la fragilité globulaire produite par l'accumulation de porphyrines dans ces cellules.

Le traitement symptomatique de la maladie est décevant : utilisation de crèmes antisolaires et réduction de l'exposition aux rayonnements UV, prise de β -carotène qui peut limiter la photosensibilité, prise d'hydroxyurée qui diminue l'érythropoïèse et donc l'hyperhémolyse, réduisant ainsi les besoins transfusionnels. La splénectomie a une efficacité très variable sur le processus hémolytique et son efficacité à long terme est très discutée. La sévérité de la maladie chez un grand nombre de patients (photosensibilité extrême avec évolution sclérodermiforme et mutilante du visage et des mains, anémie hémolytique nécessitant des transfusions répétées) conduit à proposer une greffe de moelle osseuse dans l'enfance, à condition de disposer d'un donneur HLA compatible. Treize cas de transplantation médullaire ont été publiés chez des enfants ou adolescents de 18 mois à 15 ans [3, 4-7], avec un succès thérapeutique majeur, mais un risque non négligeable en terme de mortalité (deux décès par compli-

Une maladie sévère traitée par allogreffe de moelle osseuse

Parmi les porphyries héréditaires, la porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC) ou maladie de Günther, est la plus sévère [1]. C'est une maladie génétique rare, de transmission autosomique récessive, caractérisée par un déficit en uroporphyrinogène III synthase (UROS), la quatrième enzyme de la biosynthèse de l'hème [1-3]. L'augmentation très importante de synthèse des porphyrines dans la moelle osseuse du fait du déficit enzymatique entraîne leur accumulation dans le sang et les tissus, expliquant la photosensibilité cutanée caractéristique chez les malades. Les patients pré-

cations infectieuses) et de morbidité (une GVHD, *graft versus host disease*, sévère avec séquelles chez une patiente). Le réseau européen « *European porphyria initiative* » et le centre Français des porphyries (directeur : Pr Jean-Charles Deybach), centre de référence pour ces maladies rares, mènent actuellement une étude recensant l'ensemble des patients PEC en Europe. Cette maladie pourrait bénéficier dans l'avenir d'un traitement par thérapie génique. En effet, lorsque la greffe de moelle osseuse n'est pas possible en l'absence de donneur HLA compatible, l'autogreffe de cellules génétiquement modifiées doit pouvoir la remplacer. La maladie est exprimée de manière spécifique dans le tissu érythropoïétique. La correction génétique des cellules souches/progénitrices hématopoïétiques (CSH) et l'expression du transgène dans les érythroblastes déficients doivent entraîner une guérison totale ou partielle de la maladie. Des études précliniques de thérapie génique sont actuellement poursuivies en ce sens.

Thérapie génique d'un modèle animal murin de la maladie

Un modèle murin *knock-in* de PEC ($uros^{mut248}$) reproduisant une mutation faux-sens observée dans la maladie humaine, a été obtenu dans notre laboratoire [8]. Les souris homozygotes $uros^{mut248/mut248}$ présentent les lésions de photosensibilité observées dans les formes modérées de la maladie humaine. L'accumulation de porphyrines est très importante dans la moelle osseuse, les urines et les selles. L'anémie hémolytique est présente et importante dans ce modèle : il reproduit donc de près la maladie humaine (Figure 1).

Dans une publication récente, nous exposons les résultats de la thérapie génique de ce modèle [9]. La stratégie de thérapie génique utilisée repose sur l'autogreffe de cellules médullaires génétiquement modifiées (Figure 2), stratégie *ex vivo* déjà utilisée dans de nombreux modèles de maladies hémato-immunologiques, en particulier le

modèle murin de protoporphyrie érythropoïétique ou PPE, maladie différente de la PEC [10-12]. Le vecteur lentiviral thérapeutique utilisé, dénommé Esp-URO5, est un vecteur dit « SIN » (*self inactivation*) ou auto-inactivé, possédant un promoteur spécifiquement activé dans la lignée érythroïde (HS40/Ankyrine), la séquence ADNc URO5 humaine, ainsi que l'élément de régulation post-transcriptionnel WPRE. Il est décrit dans la Figure 2A.

Les cellules 5FU/Sca-1⁺ des souris déficientes donneuses $uros^{mut248/mut248}$ ont été infectées *ex vivo* et greffées à des animaux receveurs porphyriques¹. Ces souris receveuses ont reçu un préconditionnement par le Busilvex® (busulfan injectable) afin de se rapprocher des conditions des essais cliniques effectués chez l'homme en transplantation médullaire. La correction du phénotype porphyrique est démontrée par la disparition de l'accumulation des porphyrines dans les cellules sanguines (Figure 3) et les urines, ainsi que par la restauration de l'activité enzymatique des cellules érythropoïétiques. L'efficacité du traitement est mise en évidence par la disparition de la photosensibilité et de l'anémie hémolytique (normalisation des paramètres hématologiques, régression de la splénomégalie). Le succès de greffes secondaires (les cellules médullaires greffées proviennent des premiers animaux receveurs) chez des souris porphyriques a permis de démontrer que la modification génétique avait bien eu lieu au niveau des cellules souches hématopoïétiques. De manière très intéressante, nous avons pu mettre en évidence une meilleure survie des cellules génétiquement corrigées dans la lignée érythrocytaire. Cet avantage sélectif des précurseurs des globules rouges corrigés constitue un argument important pour espérer un bénéfice thérapeutique chez l'homme, même si la totalité des cellules souches déficientes n'a pas été corrigée. Ces résultats sont différents de ceux qui sont obtenus dans la protoporphyrie érythropoïétique : il n'y a pas d'anémie hémolytique dans cette maladie, et l'avantage sélectif des progéniteurs érythroïdes corrigés n'y existe pas [10-12].

Efficacité d'un vecteur lentiviral pour la transduction *in vitro* des cellules humaines CD34⁺ issues de sujets normaux et de patients porphyriques

Des cellules souches hématopoïétiques d'un patient ont été obtenues à partir du sang périphérique après avoir été « mobilisées » par du G-CSF (*granulocyte colony-*

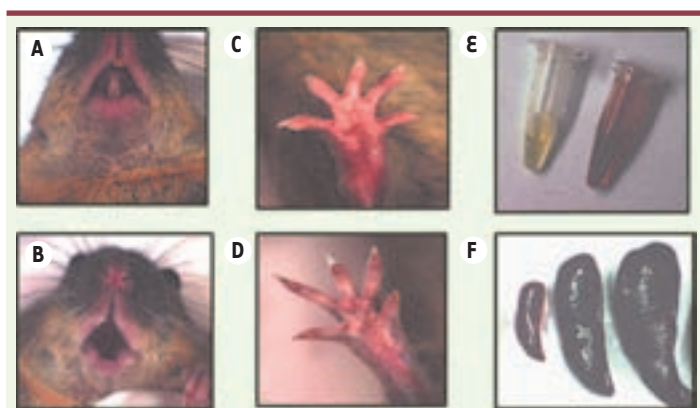


Figure 1. Quelques caractéristiques phénotypiques de la souris PEC (P) comparée à la souris normale (N). A et B. Coloration des dents caractéristique de la maladie, normale (en haut, N) et noire chez la souris PEC (en bas, P). C et D. Coloration des extrémités en relation avec l'anémie, normale (en haut, N) et pâle (en bas, souris PEC). E. Coloration des urines en relation avec l'excrétion de porphyrines : normale (à gauche, N) et rouge-porto (à droite, P). F. Taille de la rate, normale (à gauche, N) et splénomégalie massive (au milieu et à droite, P).

¹ Le traitement des souris par le 5FU (fluoro-uracile) a pour but de dépléter la moelle osseuse en progéniteurs différenciés, et en conséquence, d'enrichir l'échantillon de moelle en cellules souches hématopoïétiques.

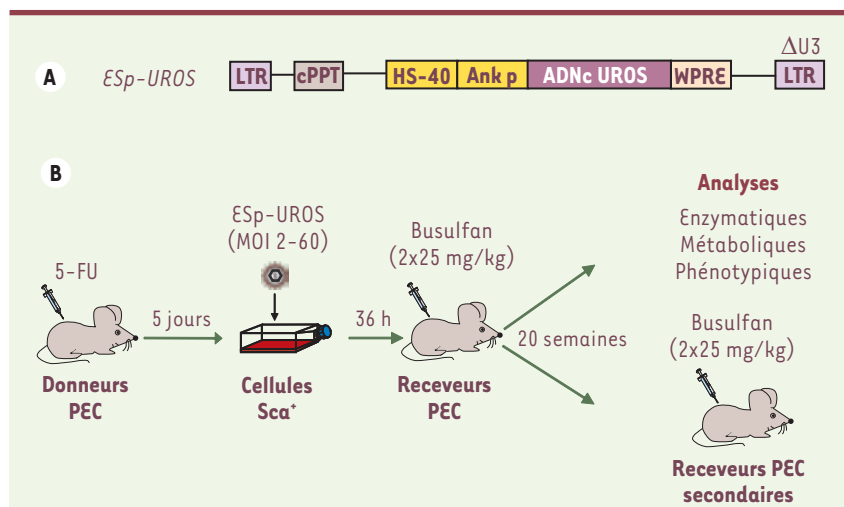


Figure 2. Stratégie de thérapie génique de la souris PEC. **A.** Représentation schématique du vecteur Esp-URO5 utilisé : celui-ci contient les séquences *cis-acting* dérivées du virus VIH (virus de l'immunodéficience humaine), une région U3 enhancer/promoteur du LTR en 3' délétée (auto-inactivation), le gène thérapeutique humain (ADNc UROS) sous le contrôle de l'enhancer/promoteur HS40/Ank et la séquence WPRE (*woodchuck post-transcriptional regulatory element*). **B.** Schéma du protocole expérimental. Après injection de 5-FU (drogue éliminant les cellules en prolifération), les cellules Sca-1⁺ de la moelle osseuse des souris porphyriques sont mises en contact avec le vecteur puis

réinjectées à une souris porphyrique receveuse traitée préalablement par le busulfan (drogue myélo-ablative). Les souris subissent un test de photosensibilité puis sont sacrifiées au bout de 20 semaines. Les cellules médullaires et sanguines ainsi que les urines sont analysées. Une partie des cellules de la moelle osseuse est injectée à des souris secondaires afin d'étudier le potentiel de correction à long terme.

stimulating factor) (à la dose minimale de 5 µg/kg/j)². Pendant la phase de recirculation, deux cytophèreses ont été réalisées permettant la collection de 1,9 x 10⁶ cellules CD34⁺/kg [13]. Ce premier résultat laisse à penser qu'il est raisonnable de pouvoir obtenir 6 x 10⁶ cellules CD34⁺/kg en utilisant une dose de 10 µg/kg/j de G-CSF et en effectuant 3 ou 4 cytophèreses. Ce nombre représente la quantité de cellules nécessaire pour le traitement par transfert de gènes ainsi que pour une éventuelle injection ultérieure de sauvegarde (*backup*) en cas de non-reconstitution hématopoïétique.

Les systèmes rétroviraux sont jusqu'à ce jour les vecteurs les plus efficaces pour le transfert de gènes dans les cellules hématopoïétiques. Plusieurs protocoles cliniques de thérapie génique de maladies génétiques sont en cours : déficits immunitaires combinés sévères DICS-X1 et DICS-ADA, granulomatoses septique chronique, drépanocytose, thalassémie, adrénoleucodystrophie. Dans le cas de la PEC, de nombreux résultats expérimentaux ont déjà démontré l'efficacité du transfert de gènes *in vitro* dans les cellules humaines à l'aide de vecteurs onco-rétroviraux murins [13, 14]. Nous avons aussi utilisé un vecteur lentiviral SIN dénommé TEUW (TRIP-ΔU3- EF1α- UROS-WPRE) possédant le promoteur ubiquitaire du facteur d'élongation humain 1α (EF1α), la séquence ADNc UROS humaine, ainsi que l'élément de régulation post-transcriptionnel WPRE. La transduction des

cellules CD34⁺ déficientes en UROS avec ce vecteur a conduit à une correction enzymatique et métabolique. L'expression du transgène est restée stable dans les cultures de ces cellules à long terme et a été maintenue au cours de leur différenciation érythroïde *in vitro*, démontrant ainsi que les érythroblastes et les globules rouges, cibles majeures de la maladie, pouvaient être corrigés [15]. Les études en cours (*in vitro* et *in vivo* chez la souris immuno-déficiente NOD/SCID ou NOG)³ consistent à démontrer que le vecteur spécifique de la lignée érythroïde utilisé chez la souris est aussi efficace sur les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques humaines.

Le choix du vecteur est essentiel pour un essai de thérapie génique chez l'homme

À la suite des 5 cas de complications graves observées au cours des essais cliniques SCID-X1 utilisant un onco-rétrovirus murin [16-18, 25], une réévaluation des conditions de sécurité associées au transfert de gènes est devenue essentielle. Une nouvelle approche thérapeutique consiste à utiliser les vecteurs lentiviraux SIN à promoteur interne [19]. Ces vecteurs sont habituellement pseudotypés avec la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), reconnue par une grande variété de cellules hôtes. Les vecteurs sont efficaces pour la transduction des cellules CD34⁺ humaines et assurent une reconstitution hématopoïétique stable comme le démontrent les expériences de xéno greffe chez la souris immunodéficiente NOD/SCID. La première publication concernant le transfert de gènes par un lentivecteur chez 5 patients atteints du Sida n'a pas montré de phénomènes de mutagenèse insertionnelle après un suivi de 21 à 36 mois

² Le terme de « mobilisation » désigne la migration des cellules médullaires (dont les cellules souches) des niches extravasculaires de la moelle osseuse vers la circulation qui est provoquée par l'administration de certaines cytokines, dont le G-CSF.

³ NOD/SCID : *non obese diabetic severe combined immunodeficient* ; NOG : souris NOD-SCID croisées avec des souris déficientes en chaîne γ du récepteur des cytokines IL-2,-9,-7,-15. Ces dernières ont un déficit immunitaire plus profond notamment en cellules *natural killer*, et facilitent la prise de greffe de cellules humaines.

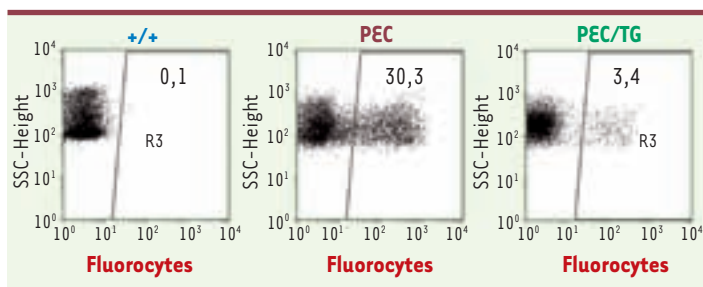


Figure 3. Illustration de la correction métabolique après thérapie génique de la souris PEC. Les globules rouges et réticulocytes des souris porphyriques (PEC) accumulent de grandes quantités de porphyrines (fluorescence rouge après excitation à 400 nm). Ces fluorocytes sont facilement détectés en cytométrie de flux. Après une thérapie génique entraînant 40 %-60 % de cellules transduites, le pourcentage de fluorocytes chute d'un facteur 10 après thérapie génique (PEC/TG). Il n'y a pas de fluorocytes (< 1 %) chez la souris normale (+/+).

[20]. La tendance plus faible des vecteurs lentiviraux (par rapport aux vecteurs onco-rétroviraux murins classiques) à s'intégrer dans des régions potentiellement dangereuses du génome est un argument en faveur de leur utilisation pour les applications cliniques [21].

Dans le cadre de la mise en place d'un protocole clinique, les choix suivants pourraient être retenus pour une amélioration de la sécurité du vecteur : (1) utilisation d'un vecteur lentiviral SIN, plus sûr en terme de risque oncogénique que les vecteurs onco-rétroviraux ; (2) suppression des promoteurs viraux potentiellement responsables d'oncogenèse insertionnelle [16-18, 21] dont nous avons souligné récemment la capacité à déréguler l'expression de promoteurs spécifiques de tissu [22] ; (3) utilisation d'un promoteur spécifique de la lignée érythroïde, limitant le risque de transactivation à la lignée érythrocytaire. Le vecteur lentiviral qui pourrait être utilisé pour l'essai clinique est très proche de celui utilisé pour la thérapie génique du modèle murin. L'amélioration supplémentaire que l'on peut apporter à la construction lentivirale est l'insertion d'un isolateur comme le *core* de l'élément 4 du site hypersensible du gène globine de poulet dénommé *chS4* [23], afin de prévenir la transactivation d'oncogènes à partir du promoteur interne du provirus intégré dans les cellules transduites. La séquence isolatrice présente aussi un deuxième intérêt qui est de protéger le promoteur interne d'une possible méthylation et donc de l'extinction de l'expression du transgène à long terme. Enfin, le remplacement de la séquence sauvage par une séquence PRE mutée plus sécurisée est préférable [24].

En conclusion, l'efficacité de la thérapie génique est bien démontrée dans ce modèle murin de PEC. La mise en évidence d'un avantage de survie des cellules corrigées par rapport aux cellules déficientes est un point favorable pour un succès futur de la thérapie génique, même si cet avantage est d'un niveau beaucoup plus faible que celui observé dans les déficits immunitaires. Le succès thérapeutique dans ce modèle élargit les perspectives curatives du transfert de gènes à d'autres pathologies telles que les anémies hémolytiques sévères d'origine génétique. ♦

SUMMARY

Successful gene therapy of mice with congenital erythropoietic porphyria

Porphyrias are a group of disorders due to a genetic deficiency in one of the heme biosynthetic pathway enzymes. Congenital erythropoietic porphyria (CEP) is the most severe type characterized by a deficiency in uroporphyrinogen III synthase (UROS) activity. Bone marrow transplantation represents a curative treatment for patients, as long as human leucocyte antigen-compatible donor is available. We used a recently obtained murine model to check the feasibility of gene therapy in this disease. Lentivirus-mediated transfer of the human UROS cDNA into hematopoietic stem cells (HSCs) from *Uros^{mut}* mice resulted in a complete and long-term enzymatic, metabolic and phenotypic correction of the disease, favored by a survival advantage of corrected red blood cells. These results demonstrate for the first time that the cure of this mouse model of CEP at moderate transduction level supports the proof of concept of a gene therapy in this disease by transplantation of genetically modified HSCs. ♦

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par l'AFM (Association Française contre les Myopathies), le Conseil Régional d'Aquitaine et l'ANR (contrat GENETHERCEP).

RÉFÉRENCES

- De Verneuil H, Ged C, Moreau-Gaudry F, et al. Les porphyries héréditaires : de la pathologie moléculaire à la thérapie génique. *Med Sci (Paris)* 1995 ; 11 : 873-8.
- Anderson KE, Sassa S, Bishop DF, Desnick RJ. *Disorders of heme biosynthesis : X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias*. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. New York : McGraw Hill, 2001 : 2991-3062.
- De Verneuil H, Moreau-Gaudry F, Ged C. Congenital erythropoietic porphyria. In : Kadish KM, Smith KV, Guillard R, eds. *The porphyria handbook*. Amsterdam : Academic Press-Elsevier Science, 2003 : 43-66.
- Dupuis-Girod S, Akkari V, Ged C, et al. Successful match-unrelated donor bone marrow transplantation for congenital erythropoietic porphyria (Gunther disease). *Eur J Pediatr* 2005 ; 164 : 104-7.
- Phillips JD, Steensma DP, Pulsipher MA, et al. Congenital erythropoietic porphyria due to a mutation in GATA1 : the first trans-acting mutation causative for a human porphyria. *Blood* 2007 ; 109 : 2618-21.
- Taijeb SM, Stevenson OE, Abdullah A, et al. Allogeneic bone marrow transplantation in a 7-year-old girl with congenital erythropoietic porphyria : a treatment dilemma. *Br J Dermatol* 2007 ; 156 : 567-71.
- Faraci M, Morreale G, Boeri E, et al. Unrelated HSCT in an adolescent affected by congenital erythropoietic porphyria. *Pediatr Transplant* 2008 ; 12 : 117-20.
- Ged C, Mendez M, Robert E, et al. A knock-in mouse model of congenital erythropoietic porphyria. *Genomics* 2006 ; 87 : 84-92.
- Robert-Richard E, Moreau-Gaudry F, Lalanne M, et al. Effective gene therapy of mice with congenital erythropoietic porphyria is facilitated by a survival advantage of corrected erythroid cells. *Am J Hum Genet* 2008 ; 82 : 113-24.
- Pawliuk R, Bachelot T, Wise RJ, et al. Long-term cure of the photosensitivity of murine erythropoietic protoporphyria by preselective gene therapy. *Nat Med* 1999 ; 5 : 768-73.

Ateliers de formation 2008

Renseignements et inscriptions :
Ateliers de formation Inserm
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex 13
Tél. : 33 (0)1 44 23 62 04 — Fax : 33 (0)1 44 23 62 93
ateliers@tolbiac.inserm.fr

Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

■ Atelier de formation n° 191

Imagerie du petit animal : méthodes d'imagerie médicale pour l'exploration anatomique, fonctionnelle et moléculaire *in vivo*

Organisateurs : Sylvie Chalon (Inserm U930, Tours), Marc Janier (Animage, Lyon), Chantal Rémy (Institut des Neurosciences/U836, Grenoble)

Phase I • Le point sur...
19-21 octobre 2008 • Saint-Raphaël

Objectifs • L'imagerie du petit animal devient un outil indispensable de recherche dans de nombreux domaines. Cette exploration est nécessaire pour la sélection de lignées génétiquement modifiées, les études de métabolisme *in vivo*, de l'efficacité et de la toxicité de médicaments, des mécanismes physiologiques et pathologiques, et la mise au point de nouvelles techniques d'imagerie. Les modèles animaux les plus classiques sont les rongeurs (souris, rats) et les petits primates comme le marmouset. L'imagerie du petit animal repose sur des techniques complémentaires et souvent très sophistiquées, dont la mise en pratique nécessite une compétence à la fois technologique et expérimentale de qualité. Il existe de nombreuses méthodes d'imagerie applicables au petit animal : imagerie optique, rayons X, IRM, SRM, échographie-doppler, TEP (Tomographie d'Emission de Positons) et TEMP (Tomographie d'Emission MonoPhotonique). Ces méthodes présentent un large éventail de paramètres anatomiques et fonctionnels analysables. L'objectif de l'atelier est de présenter aux biologistes les différentes techniques existant à l'heure actuelle, les paramètres auxquels chaque méthode permet d'accéder, leurs avantages et leurs limites. Il devrait permettre de connaître l'ensemble des possibilités actuelles et de définir les méthodes les plus appropriées en fonction des problématiques.

Public • Médecins et biologistes (chercheurs, techniciens, ingénieurs, doctorants et post-doctorants), du monde académique ou industriel, mettant en œuvre ou désireux de recourir à l'imagerie du petit animal.
Les conférences seront données en anglais.

Nombre maximum de participants : 80.

Programme •

- Exposé didactique, avantages et limites des méthodes les plus couramment utilisées pour chaque type d'organe ou de tissu
- Exemples d'utilisation de l'imagerie pour répondre à une question biologique concernant un organe ou un tissu : (imagerie optique, TEP, TEMP), os (imagerie X), cerveau (IRM, SRM, TEP, TEMP), coeur (échographie-doppler) ou un tissu en oncologie (imagerie optique, TEP, TEMP),
- Aspects d'imagerie cellulaire, de traitement et d'analyse d'image

Phase II • Maîtrise technique
22-24 octobre 2008

Programme •

- Lyon : US, scanner X, TEP, TEMP, IRM, optique
- Grenoble : IRM, optique, TEMP, TEP
- Tours/Orléans : US, TEP, TEMP, IRM, optique, CT

Sélection • 30 participants seront sélectionnés parmi les participants de la phase I.

Avec la participation de • Claire Billotey (Lyon, France), Irène Buvat (Paris, France), Jean-Luc Coll (Grenoble, France), Angèle Viola (Marseille, France), Cyril Desvignes (Lyon, France), Daniel Fagret (Grenoble, France), Philippe Hantraye (Orsay, France), Olga Millan (Barcelone, Espagne), Laurent Monassier (Illkirch, France), François Moutou (Maisons-Alfort, France), Greetje Vanhoutte (Antwerp, Belgium), Laurence Vico (Saint-Étienne, France).

Date limite d'inscription : 15 juillet 2008