

## Thérapie génique de maladies infectieuses : le modèle du SIDA<sup>(1)</sup>

Tania Sorg  
Philippe Leissner  
Valérie Calenda  
Pierre Leroy  
Kamel Sanhadji  
Jean-Louis Touraine  
Andrea Pavirani  
Majid Mehtali

L'absence actuelle de médicaments efficaces contre la maladie mortelle qu'est le SIDA a fait s'orienter vers un nouveau mode thérapeutique, la thérapie génique. Le VIH-1 infectant surtout les cellules du système hématopoïétique, les cellules souches sont les candidates naturelles pour accueillir les gènes à visée thérapeutique. La définition de ces derniers n'est pas achevée. Les gènes codant pour les interférons constituent aujourd'hui la voie la plus prometteuse car la synthèse de ces antiviraux est inhibée dans le SIDA. Une astuce intéressante consiste à placer les gènes transférés sous la dépendance d'un promoteur activé par la protéine TAT de VIH-1, si bien que seules les cellules infectées par le VIH-1 synthétisent les interférons ; sécrétés, ils protègent les cellules avoisinantes. De nombreuses autres stratégies sont en cours d'évaluation, grâce à l'utilisation de modèles animaux (souris *scid* infectée par le VIH-1, macaques infectés par SIV). Un préalable aux études cliniques reste de savoir manipuler correctement les cellules souches sanguines.

### ADRESSES

K. Sanhadji : maître de conférence. J.L. Touraine : professeur des universités. Inserm U.80, hôpital Édouard-Herriot, 69437 Lyon Cedex 03, France. T. Sorg : boursière CIFRE. P. Leissner : boursier MRE. V. Calenda : docteur ès sciences. P. Leroy : docteur ès sciences. A. Pavirani : directeur scientifique adjoint. M. Mehtali : chef du département de thérapie génique. Transgène, 11, rue de Molsheim, 67000 Strasbourg, France.

<sup>(1)</sup> Cet article a été présenté en partie sous la forme d'une communication orale lors du colloque « Thérapie Génique » du Centre de conférences de la Fondation Marcel Mérieux, Les Pensières, Veyrier-du-Lac, France (30 novembre au 2 décembre 1994). Responsable scientifique : Marie Favrot.

Voilà bientôt treize ans que l'agent étiologique du SIDA a été identifié et onze ans que l'action anti-rétrovirale de la zidovudine (AZT<sup>®</sup>) a été mise en évidence. Depuis, malgré l'accumulation impressionnante des connaissances concernant l'organisation génétique et la biologie du VIH-1, et malgré les efforts investis dans le développement de nouvelles molécules antivirales, aucun médicament réellement satisfaisant n'a encore été trouvé. Si d'autres inhibiteurs de la transcriptase

inverse (ddI, ddC) ont bien été découverts et sont aujourd'hui proposés pour une utilisation combinée à l'AZT<sup>®</sup>, leur toxicité à long terme et l'apparition durant le traitement de variants viraux résistants limitent leur utilisation. Une nouvelle génération de molécules antivirales a été plus récemment développée et est en évaluation clinique ; ce sont les inhibiteurs de la protéase virale. Cependant, l'importance des doses thérapeutiques requises (2,4 g/jour/patient, soit environ un kg par an), associée à la difficulté de leur synthèse et de leur

production en quantité satisfaisante, ainsi que l'apparition de mutants viraux résistants à l'ensemble des anti-protéases existantes [1], limitent sévèrement leur évaluation. Cette absence de traitements du SIDA réellement efficaces à long terme impose la recherche de thérapies alternatives, et ouvre la voie à l'évaluation d'approches moins conventionnelles, telle la thérapie génique somatique. Bien qu'initialement proposé pour le traitement de maladies héréditaires ou de certains cancers [2], ce concept de thérapie génétique a vu son champ d'application potentiel étendu aux maladies virales, parmi lesquelles le SIDA s'est évidemment imposé comme une cible prioritaire en raison de son caractère létal et de sa chronicité [3]. Par ailleurs, le tropisme particulier du VIH-1 pour les cellules hématopoïétiques est également un élément en faveur d'un possible traitement par thérapie

génique, les cellules souches hématopoïétiques étant, en effet, des cibles privilégiées pour l'introduction d'un gène thérapeutique. La différenciation et la prolifération de ces cellules après modification génétique devraient pouvoir engendrer une descendance hématopoïétique différenciée, résistante à l'infection et/ou à la réplication virale. L'administration aux patients de leurs propres cellules souches ainsi manipulées pourrait, théoriquement, permettre une repopulation permanente de leur système hématopoïétique par une population cellulaire « immunisée » contre le virus, suivant le concept défini par D. Baltimore [4], avec pour conséquence un possible ralentissement *in vivo* de la propagation virale (figure 1). Naturellement, si l'absence actuelle d'antiviraux satisfaisants justifie amplement la recherche de thérapeutiques alternatives innovantes, le développement et

## RÉFÉRENCES

1. Condra JH, Schleif WA, Blahy OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, Rhodes A, Robbins HL, Roth E, Shivaprakash M, Titus D, Yang T, Tepler H, Squires KE, Deutsch PJ, Emini EA. *In vivo* emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* 1995; 374: 569-71.
2. Verma I. La thérapie génique. *Pour la science* 1991; 159: 44-52.
3. Levy JP. Traitements du SIDA: recherche de nouveaux médicaments et élaboration de thérapies géniques. *médecine/sciences* 1991; 7: 830-41.
4. Baltimore D. Intracellular immunization. *Nature* 1988; 335: 395-6.
5. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 727-77.
6. Ho DD, Neumann AV, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373: 123-6.
7. Francis ML, Meltzer MS, Gendelman HE. Interferons in the persistence, pathogenesis, and treatment of HIV infection. *AIDS Res Hum Retrovir* 1992; 8: 199-207.
8. Hartshorn KL, Neumeyer D, Vogt MW, Schooley RT, Hirsch MS. Activity of IFN $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  against HIV-1 replication *in vitro*. *AIDS Res Hum Retrovir* 1987; 3: 125-33.
9. Coccia EM, Krust B, Hovanessian AG. Specific inhibition of viral protein synthesis in HIV-infected cells in response to interferon treatment. *J Biol Chem* 1994; 37: 23083-94.
10. Mitsuyaru RT. Use of recombinant interferons and hematopoietic growth factors in patients infected with HIV-1. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 979-84.

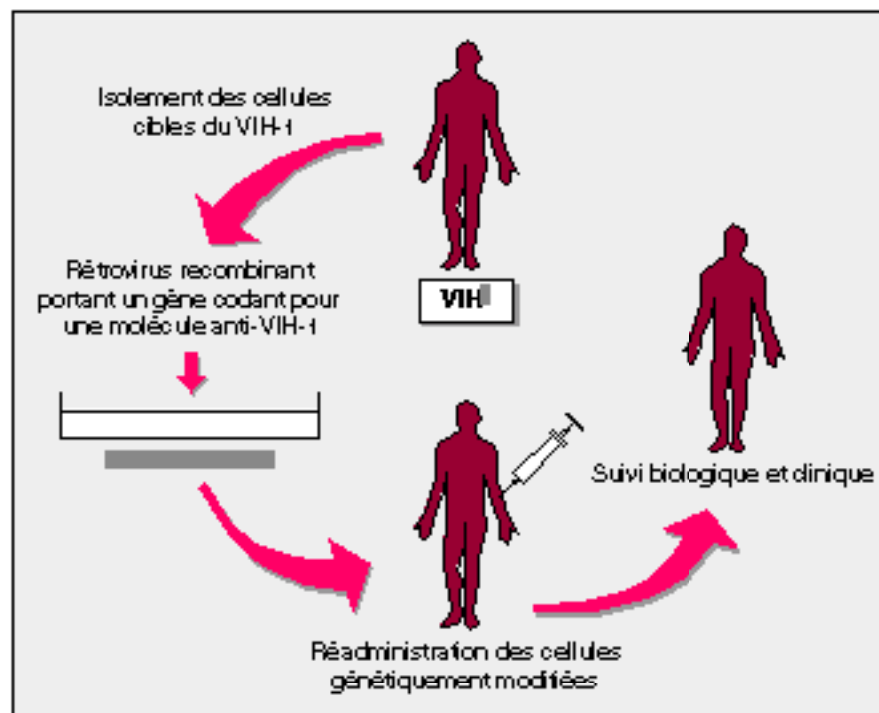


Figure 1. **Principe d'une thérapie génique du SIDA.** Les cellules cibles (cellules souches hématopoïétiques ou lymphocytes CD4<sup>+</sup> circulants) de patients séropositifs sont prélevées, purifiées et modifiées génétiquement *ex vivo* par un vecteur rétroviral leur conférant une résistance à l'infection et/ou à la propagation du VIH-1. La réadministration autologue de ces cellules devrait permettre une repopulation du système hématopoïétique du patient par des cellules mûres résistantes au virus.

## RÉFÉRENCES

11. Paredes J, Krown SE. Interferon-alpha therapy in patients with Kaposi's sarcoma and the acquired immunodeficiency syndrome. *Int J Immunopharmacol* 1991; 13: 77-81.
12. Poli G, Biswas P, Fauci AS. Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antiviral Res* 1994; 24: 221-33.
13. Lane HC, Davey V, Kovacs JA, Feinberg J, Matcalf JA, Herpin BH, Walker R, Deyton L, Davey RT, Fallon J, Polis M, Slazman NP, Baseler M, Masur H, Fauci AS. Interferon-alpha in patients with asymptomatic human immunodeficiency virus infection: a randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1990; 112: 805-11.
14. Capobianchi MR, Mattana P, Mercuri F, Conciatori G, Ameglio F, Ankel H, Dianzani F. Acid lability is not an intrinsic property of interferon-alpha induced by HIV-infected cells. *Interferon Res* 1992; 12: 431-8.
15. Steffy K, Wong-Staal F. Genetic regulation of HIV. *Microbiol Rev* 1991; 55: 193-205.
16. Mehtali M. Des virus pour greffer des gènes. *La Recherche* 1994; 270: 1116-9.
17. Bednarik, DPMosca JD, Raj NBK, Pitha P. Inhibition of HIV replication by HIV-transactivated  $\alpha 2$ -interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4958-62.
18. Su Y, Popik W, Pitha P. Inhibition of HIV1 replication by a TAT-activated, transduced interferon gene: targeted expression to HIV-1-infected cells. *J Virol* 1995; 69: 110-21.
19. Hansen BD, Nara PL, Maheshwari RK, Sidhu GS, Bernbaum JG, Hoekzema D, Meltzer MS, Gendelmann HE. Loss of infectivity by progeny virus from alpha-interferon treated HIV1-infected T cells is associated with defective assembly of envelope gp120. *J Virol* 1992; 66: 7543-8.

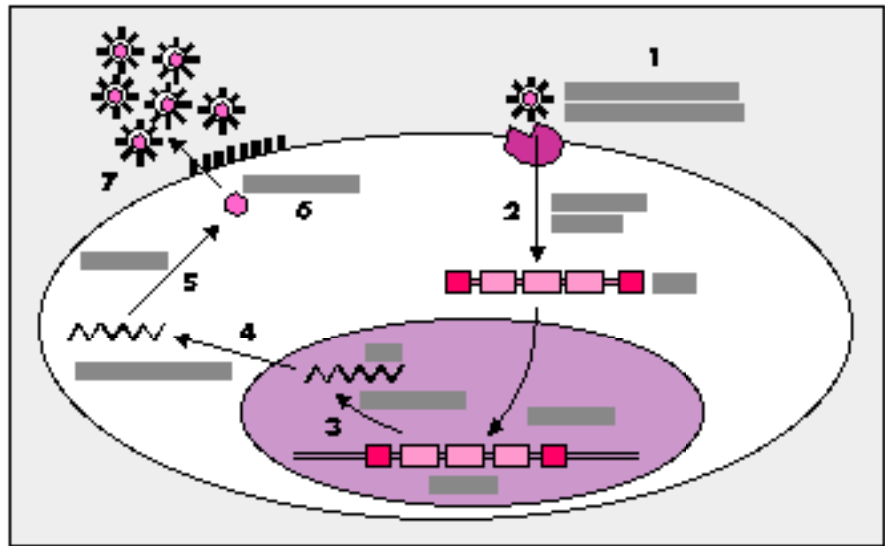


Figure 2. Cycle de réplication du VIH-1 et cibles moléculaires pour une thérapie génique du SIDA. Chaque étape du cycle viral peut constituer une cible d'intervention antivirale. Les agents génétiques antiviraux en évaluation dans le monde sont : **étape 1** : CD4 soluble, anticorps anti-Env intracellulaires ou sécrétés ; **étape 2** : ribozymes, anticorps intracellulaires antitranscriptase inverse (anti-RTase), IFN ; **étape 3** : leurres de la séquence TAR, cible de TAT, inhibiteurs transdominants de TAT, ribozymes, ARN antisens, IFN ; **étape 4** : inhibiteurs transdominants REV, leurres de la séquence RRE de réponse à REV ; **étape 5** : ARN antisens, ribozymes ; **étape 6** : inhibiteurs transdominants GAG, CD4 intracellulaires, IFN ; **étape 7** : anticorps anti-Env, « suicide induit ».

l'évaluation de nouvelles molécules antivirales restent évidemment une priorité, en raison même du caractère innovant et de la complexité de la thérapie génique, et des nombreuses incertitudes qui y sont associées.

### Stratégies d'intervention antivirales et cibles moléculaires

Une thérapie génique du SIDA ne peut être sérieusement envisagée qu'à la condition de lever les nombreux obstacles scientifiques et techniques qui en font encore une thérapie expérimentale. Le premier de ces obstacles est de disposer de stratégies antivirales qui soient non toxiques et efficaces. Une résistance cellulaire vis-à-vis de l'infection ou de la propagation virale peut théoriquement être obtenue par transfert 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 cyto-

plasme, ou encore l'accumulation cytoplasmique de ces ARN (figure 2). Des étapes plus tardives du cycle viral peuvent également être ciblées : ainsi, le transfert de gènes dont les produits répriment la néoformation de particules infectieuses ou confèrent aux cellules voisines un état réfractaire à l'infection devrait permettre un blocage efficace de la propagation virale (figure 2). Étant donné la complexité moléculaire et biologique du VIH-1, il est cependant difficile de prédire quelle stratégie de thérapie génique sera la plus efficace. C'est pourquoi le développement et l'évaluation parallèle *in vitro* et *in vivo* de plusieurs approches complémentaires sont essentiels. Il est possible, en outre, qu'une seule approche ne puisse complètement bloquer la réplication virale et qu'il soit nécessaire d'associer plusieurs inhibiteurs génétiques. Cet article a pour objet de faire le point sur les différentes stratégies actuellement en cours d'évaluation dans divers laboratoires, dont le nôtre, et de mettre en relief leurs avantages et limitations respectifs.

## RÉFÉRENCES

20. Emerman M, Guyader M, Montagnier L, Baltimore D, Muesing M. The specificity of HIV-2 transactivator is different from that of HIV-1. *EMBO J* 1987; 6: 3755-60.
21. Veillard V, Lauret E, Rousseau V, DeMayer E. Blocking of retroviral infection at a step prior to reverse transcriptase in cells transformed to constitutively express interferon  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2689-93.
22. Friedman AD, Triezenberg SJ, McKnight SL. Expression of a truncated viral transcriptor selectively impedes lytic infection by its cognate virus. *Nature* 1988; 335: 452-5.
23. Malim MH, Bohnlein S, Hauber J, Cullen BR. Functional dissection of the HIV1 REV transactivator-derivation of a transdominant repressor of REV function. *Cell* 1989; 58: 205-14.
24. Malim MH, Freimuth WW, Liu J, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR, Nabel G. Stable expression of transdominant REV protein in human T cells inhibits HIV replication. *J Exp Med* 1992; 176: 1197-201.
25. Bevec D, Dobrovnik M, Hauber J, Bohnlein E. Inhibition of HIV1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative REV transactivator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 9870-4.
26. Pearson L, Garcia J, Wu F, Modesti N, Nelson J, Gaynor R. A transdominant TAT mutant that inhibits TAT-induced gene expression from the HIV1 long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5079-83.
27. Green M, Ishino M, Lowenstein PM. Mutational analysis of HIV1 TAT minimal domain peptides: identification of transdominant mutants that suppress HIV-LTR driven gene expression. *Cell* 1989; 58: 215-23.
28. Modesti N, Garcia J, Debouck C, Peterlin M, Gaynor R. Transdominant TAT mutants with alterations in the basic domain inhibit HIV1 gene expression. *New Biol* 1991; 3: 759-68.

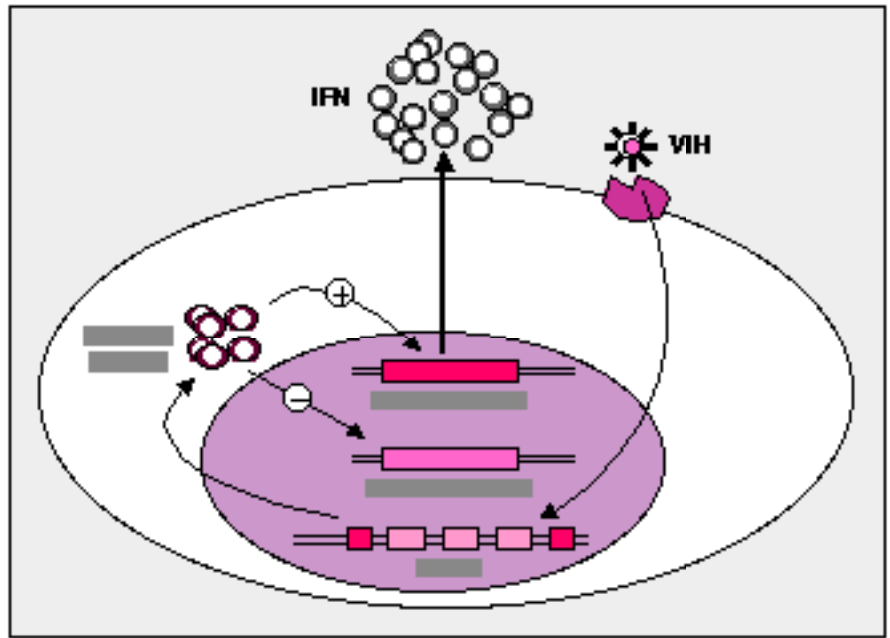


Figure 3. **Reconstitution génétique de défenses cellulaires antivirales naturelles: le cas des interférons (IFN).** Bien qu'étant in vitro de puissants inhibiteurs de la réplication/propagation du VIH-1, les IFN ne peuvent limiter la réplication virale car leur synthèse est réprimée par des mécanismes encore mal compris. Ces défenses peuvent être reconstituées par un transfert dans les cellules des gènes IFN $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  dont l'expression a été placée sous le contrôle de la protéine virale TAT. Toute infection par VIH-1 devrait, en conséquence, réprimer les gènes IFN cellulaires mais induire l'expression des gènes transférés. Les IFN relargués dans le milieu extracellulaire devraient également induire un état de résistance au VIH-1 des cellules avoisnantes non génétiquement modifiées.

### Reconstitution génétique des mécanismes cellulaires naturels de défense antivirale: le cas des interférons

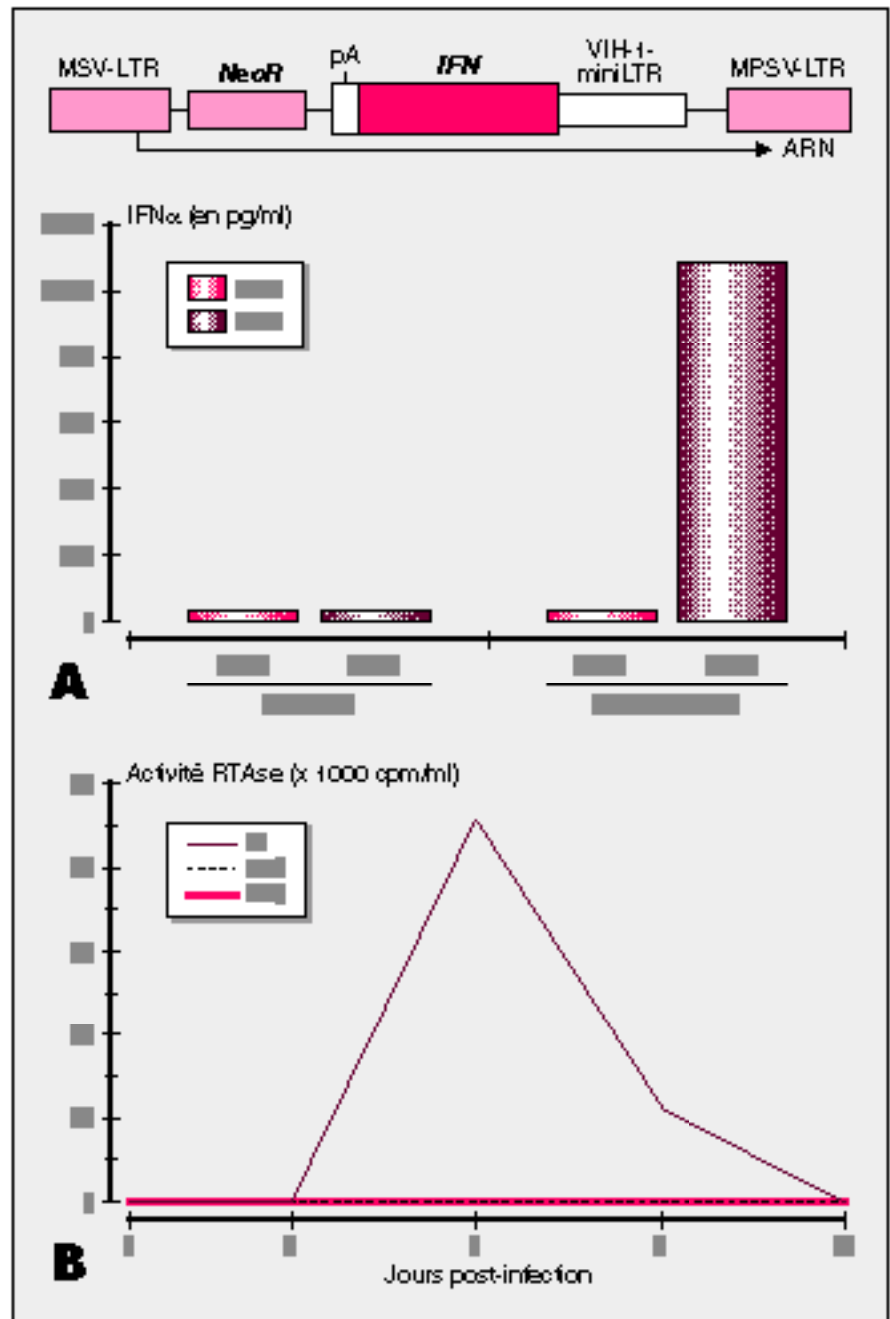
La synthèse des interférons (IFN) constitue l'un des puissants systèmes de défense développés par la cellule contre les infections virales [5]. Cependant, dans le cas du SIDA, le VIH-1 contourne ces défenses immunologiques de l'hôte par destruction des lymphocytes CD4<sup>+</sup> [6], mais aussi par répression de la synthèse des IFN par des mécanismes transcriptionnels et/ou post-transcriptionnels encore mal compris [7]. Or, il a été démontré par plusieurs équipes que l'ajout d'IFN exogènes, notamment des IFN $\alpha$  et  $\beta$ , pouvait efficacement contrôler la réplication virale dans différents systèmes d'infections chro-

niques et aiguës [8, 9]. Sur la base de ces observations, plusieurs protocoles cliniques visant à évaluer chez des patients séropositifs les propriétés antivirales des IFN ont été lancés. Ces études ont permis de démontrer, après administration sous-cutanée d'IFN $\alpha$ , un effet antiviral significatif, ainsi qu'une action antitumorale dans le cas du sarcome de Kaposi associé au SIDA, chez les patients ayant un nombre élevé de cellules CD4<sup>+</sup> (> 200) et dont le système immunitaire est encore relativement fonctionnel [10-13]. Cette action antivirale est en revanche inexistante chez des patients à un stade plus avancé de la maladie. Par ailleurs, malgré des conclusions parfois contradictoires en raison de protocoles en nombre limité et souvent différents, aucun effet antiviral clair n'a été associé à l'administration d'IFN $\beta$  ou d'IFN $\gamma$ . Les IFN constituent donc des molécules anti-

## RÉFÉRENCES

29. Nabel JG, Fox BA, Post L, Thomson GB, Woffendin C. A molecular genetic intervention for AIDS effects of a transdominant negative form of REV. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 79-92.
30. Mehtali M, Munsch M, Caillaud JM, Kieny MP. HIV1 regulatory genes induce AIDS-like pathologies in transgenic mice. In: Girard M, Valette L, eds. *Retroviruses of human AIDS and related animal diseases*. Lyon: Fondation Marcel Merieux, 1991: 25-30.
31. Emini EA, Scheidl WA, Nunberg JH, Conley AJ, Eda Y, Tokiyoshi S, Putney SD, Matsushita S, Cobb KE, Jett CM, Eichberg JW, Murthy KK. Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature* 1992; 355: 728-30.
32. Putkonen P, Thorstenson R, Ghavamzadeh L, Albert J, Hild K, Biberfeld G, Norrby E. Prevention of HIV-2 and SIVsm infection by passive immunization in cynomolgus monkeys. *Nature* 1992; 352: 436-8.
33. Moullier P, Böhl D, Cardoso J, Heard JM, Danos O. Long term delivery of a lysosomal enzyme by genetically modified fibroblasts in dogs. *Nature Med* 1995; 1: 353-7.
34. Muster T, Guinea R, Trkola A, Pürstchner M, Klima A, Steindl F, Palese P, Katinger H. Cross-neutralization activity against divergent human immunodeficiency virus type I isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. *J Virol* 1994; 68: 4031-4.
35. Conley AJ, Kessler JA, Boots LJ, Tung JS, Arnold BA, Keller PM, Shaw AR, Emini EA. Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type I variants and primary isolates by IAM-41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3348-52.
36. Purtscher M, Trkola A, Gruber G, Buchacher A, Predl R, Steindl F, Tauer C, Berger R, Barrett N, Jungbauer A, Katinger H. A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp 41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retrovir* 1994; 12: 1651-8.
37. Bosma MJ, Carroll AM. The *scid* mouse mutant: definition, characterisation and potential uses. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 323-50.
- virales à considérer avec attention, mais dont les conditions optimales d'utilisation sont encore à finaliser. Cela d'autant plus que la relation entre les interférons et la pathogénie du SIDA est complexe et reste mal comprise. Les patients présentent en effet une augmentation sérique d'une forme aberrante d'IFN $\alpha$ , qui est de mauvais pronostic. Cette forme labile à pH acide, également décrite dans certaines maladies auto-immunes [14], est inactive vis-à-vis du VIH-1 mais conserve une activité antivirale normale vis-à-vis d'autres virus. La nature précise de cette inactivation n'est pas établie. Une approche potentielle de thérapie génique du SIDA peut consister en une reconstitution génétique de ce système naturel de défense antivirale. Cela peut théoriquement être réalisé par un transfert dans les cellules hématopoïétiques des gènes codant pour les IFN humains, mais en plaçant ceux-ci au préalable sous le contrôle de séquences régulatrices contenues dans la région LTR (*long terminal repeat*) du génome VIH-1. L'activité promotrice de ces séquences étant spécifiquement réglée par la protéine TAT de VIH-1 [15], l'infection virale devrait réprimer les gènes IFN cellulaires et, au contraire, induire la synthèse et la sécrétion des IFN codés par les gènes transférés (*figure 3*). Cette production d'IFN consécutive à l'infection virale devrait conférer aux cellules ayant intégré les gènes transférés et aux cellules voisines une résistance à la réplication et à la propagation du VIH-1. Une validation de cette hypothèse nécessite de pouvoir intégrer ces gènes efficacement et de manière permanente dans les cellules cibles du virus, ou mieux, leurs cellules souches. Les vecteurs de transfert génétique les mieux adaptés à cet effet étant aujourd'hui les vecteurs rétroviraux [16], de tels vecteurs, dans lesquels l'expression des gènes IFN humains peut être fortement induite par la protéine TAT du VIH-1, doivent donc être développés. Une telle stratégie a été proposée et entreprise dès 1989 par l'équipe de P. Pitha, à l'université Johns Hopkins (Baltimore, MD, USA), qui a construit un vecteur rétroviral portant le gène IFN $\alpha 2$  sous le contrôle des séquences LTR du VIH-1 [17].
- Ce groupe a ainsi démontré qu'une lignée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humaine infectée par ce vecteur rétroviral était effectivement fortement résistante à la réplication virale, et une augmentation notable de l'expression du gène IFN $\alpha 2$  a été mise en évidence dans ces cellules après l'infection par le VIH-1. Dans une étude plus récente [18], cette même équipe a tenté d'améliorer la spécificité de la régulation par VIH-1 de l'expression du gène IFN $\alpha 2$  afin d'éliminer toute possibilité d'induction de la synthèse d'IFN par d'autres stimuli que l'infection virale. Ils ont pour cela inséré le gène IFN $\alpha 2$  sous le contrôle d'une séquence promotrice hybride dans laquelle les éléments NF- $\kappa$ B de la région LTR de VIH-1 ont été remplacés par des éléments de régulation issus du gène ISG15 inducible par l'IFN $\alpha$  [18]. Si dans un tel vecteur l'expression du gène IFN s'avère effectivement toujours inducible par la protéine TAT de VIH-1, et non plus par un stimulus non spécifique tel le *tumor necrosis factor* (TNF), en revanche, le niveau basal d'IFN en l'absence de TAT reste relativement élevé. De plus, les titres des vecteurs rétroviraux utilisés par cette équipe sont extrêmement faibles (environ 10<sup>3</sup> particules virales par millilitre de surnageant de culture), limitant sévèrement toute possibilité d'infecter efficacement les cellules hématopoïétiques cibles [18]. Pour notre part, nous avons développé une approche similaire, mais en mettant l'accent sur la nature du vecteur rétroviral. Nous avons mis au point un vecteur à régulation fine permettant une expression du gène IFN $\alpha$  qui soit négligeable voire nulle en l'absence de TAT, mais forte en présence de cette protéine (*figure 4*), et dont le titre est très élevé (supérieur à 10<sup>6</sup> particules par millilitre). De plus, nous avons étendu cette étude aux IFN $\beta$  et  $\gamma$ , afin d'évaluer les propriétés respectives de ces différentes molécules. Une infection par le vecteur de lignées lymphocytaires, promonocytaires, de lymphocytes primaires ou même des lymphocytes CD4<sup>+</sup> purifiés a ainsi pu être réalisée de façon très efficace et reproductible, permettant une étude détaillée de la sensibilité de ces cellules au VIH-1: si une infection initiale a bien été systématiquement mise en évidence par

Figure 4. **L'infection de lymphocytes humains primaires par des vecteurs rétroviraux portant des gènes IFN dont l'expression est inducible par TAT leur confère une protection contre l'infection par VIH-1.** A. Une cassette d'expression contenant les gènes *IFN* $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  sous le contrôle des séquences de régulation par TAT (VIH1-mini LTR contenant les éléments NF- $\kappa$ B et Sp1, la boîte TATA et les séquences TAR) et du signal de polyadénylation de SV40 (pA) a été introduite en orientation antisens dans un vecteur rétroviral murin. Celui-ci comprend en 5' la région LTR du mouse sarcoma virus (MSV-LTR), du dirigeant l'expression du gène de sélection NeoR, et en 3' la région LTR du myeloproliférative sarcoma virus (MPSV-LTR). L'infection par ces vecteurs d'une lignée lymphocytaire humaine CD4<sup>+</sup> (CEMx174) et l'introduction dans ces cellules infectées du gène *tat* permettent la mise en évidence d'une forte induction de la sécrétion d'IFN uniquement dans les cellules génétiquement modifiées. B. Des lymphocytes primaires infectés par les vecteurs rétroviraux portant les gènes IFN $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  ont également été infectés in vitro par VIH-1 (isolat clinique BX08) au jour 0, et la réplication virale a été déterminée par dosage de l'activité transcriptase inverse (RTase) dans les surnageants de culture. Une inhibition totale de la réplication virale est observée uniquement dans les lymphocytes infectés, mais pas dans les lymphocytes témoins (-).



diverses techniques (PCR, P24...), aucune réplication et propagation du virus n'ont été détectées dans les cellules infectées par le vecteur (figure 4B). Ces cellules sont, en outre, totalement résistantes à l'effet cytopathogène du virus, alors que les cellules témoins sont toutes détruites deux semaines après l'infection. Cet état

antiviral a pu être corrélé à l'induction par le virus d'une forte synthèse d'IFN sécrétés dans le surnageant de culture des cellules infectées par le vecteur. Une altération importante de la maturation des particules virales a également été observée dans le cas de cellules ayant intégré le gène *IFN* $\gamma$ , confortant l'hypothèse

d'une implication des IFN dans l'induction de cet état antiviral; des études antérieures avaient, en effet, démontré un tel mode d'action de ces molécules [19]. Comme prévu, ces mêmes cellules sont, en revanche, totalement permissives au VIH-2: la protéine TAT de VIH-2 n'interagissant pas avec les séquences LTR de

VIH-1 [20], la synthèse des IFN ne peut en effet être induite par l'infection par le VIH-2.

Le large spectre d'action des IFN en fait des molécules très attrayantes pour une thérapie génique du SIDA. En effet, non seulement les IFN réduisent très fortement la quantité absolue de particules virales produites, mais l'intégrité et le pouvoir infectieux de ces particules sont également altérés. De plus, les IFN étant des molécules sécrétées pouvant conférer un état antiviral aux cellules avoisinantes, il est fort probable qu'il ne soit pas nécessaire de transduire toutes les cellules cibles pour protéger la globalité de la population cellulaire. Ce point est essentiel car il n'est techniquement pas possible aujourd'hui d'espérer modifier génétiquement toutes les cellules CD4<sup>+</sup> du patient, même après infection par le vecteur des cellules souches hématopoïétiques. Par ailleurs, contrairement aux autres protéines antivirales considérées pour une thérapie génique du SIDA, ce sont des protéines de l'hôte contre lesquelles aucune réaction immunitaire pouvant entraîner le rejet des cellules manipulées ne peut théoriquement se développer. De plus, la synthèse de ces molécules étant ici inducible par l'infection virale, elle devrait être faible et localisée, et donc reproduire une situation physiologique normale. Malgré évidemment de nombreuses inconnues quant à la réelle efficacité *in vivo* d'une telle approche, celle-ci nous paraît néanmoins constituer aujourd'hui la stratégie de thérapie génique du SIDA la plus prometteuse. Une approche relativement semblable est actuellement également développée par le groupe du Pr E. DeMayer, à l'Institut Curie (Paris, France) : cette équipe a démontré que des lignées lymphocytaires et promonocytaires exprimant constitutivement *IFN $\beta$*  humain à des doses faibles sont résistantes à une pénétration du VIH-1 [21]. Cependant, une expression constitutive de *IFN $\beta$*  pourrait constituer une limitation potentielle à toute future évaluation clinique. L'impact d'une telle expression *in vivo*, faible mais constitutive, de *IFN $\beta$*  devra probablement être attentivement évalué avant une application chez l'homme.

## **Inhibition des fonctions régulatrices des protéines virales TAT et REV**

Produites très précocement durant le cycle viral, les protéines TAT et REV sont essentielles à la réplication de VIH-1 : TAT permet l'élongation de la transcription des gènes viraux (*m/s n° 6, vol. 5, p. 344; n° 10, vol. 5, p. 791*) et REV favorise le transport vers le cytoplasme des ARN codant pour les protéines structurales (*m/s n° 6, vol. 5, p. 423*) [15]. Le rôle primordial de ces deux protéines virales régulatrices en fait évidemment des cibles de premier choix pour la mise au point de molécules antivirales, ou pour le développement de protocoles de thérapie génique. Depuis la démonstration en 1988 que l'expression intracellulaire du variant tronqué d'une protéine régulatrice du virus *Herpes simplex* de type 1 pouvait protéger ces cellules contre une infection lytique [22], plusieurs équipes, dont la nôtre, ont tenté d'appliquer une approche similaire au VIH-1.

Les protéines TAT et REV sont des protéines nucléaires organisées en domaines biologiques distincts (*figure 5*), dont notamment un domaine de localisation nucléaire et de fixation aux séquences virales cibles, un domaine de dimérisation (TAT) ou de multimérisation (REV), et un domaine de transactivation impliqué dans l'interaction de ces protéines avec des protéines cellulaires essentielles à la fonction de TAT et REV [15]. Cette caractérisation fonctionnelle fine de TAT et REV est l'aboutissement de nombreuses études systématiques des propriétés biologiques de variants protéiques engendrés, soit par mutagenèse dirigée, soit par production de peptides correspondant à des fractions successives des protéines TAT et REV [23-28]. Ces études ont permis de démontrer que certaines mutations affectant les domaines d'activation pouvaient engendrer des mutants ayant perdu toute activité régulatrice mais capables de bloquer en *trans* l'action des protéines virales natives. Nos propres travaux ont confirmé ces observations et mis en évidence une localisation bien définie des acides aminés dont la mutation permet la

## **RÉFÉRENCES**

38. Valère T, Bohl D, Klatzmann D, Danos O, Sonigo P, Heard JM. Continuous secretion of human soluble CD4 in mice transplanted with genetically modified cells. *Gene Ther* 1995; 2: 197-202.
39. Yamada O, Yu M, Yee JK, Kraus G, Looney D, Wong-Staal F. Intracellular immunization of human T cells with a hairpin ribozyme against human immunodeficiency virus type 1. *Gene Ther* 1994; 1: 38-45.
40. N Sarver, EM Cantin, PS Chang, JA Zaia, PA Ladne, DA Stephens, JJ Rossi. Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science* 1990; 247: 1222-5.
41. Lisziewicz J, Sun D, Smythe J, Lusso P, Lori P, Louie A, Markham P, Rossi J, Reitz M, Gallo RC. Inhibition of HIV-1 replication by regulated expression of a polymeric TAT activation response RNA decoy as a strategy for gene therapy in AIDS. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8000-4.
42. Sczakiel G, Oppenländer M, Rittner R, Pawlita M. Tat- and Rev-directed antisense RNA expression inhibits and abolishes replication of human immunodeficiency virus type 1: a temporal analysis. *J Virol* 1992; 66: 5576-81.
43. Rhodes A, James W. Inhibition of heterologous strains of HIV by antisense RNA. *AIDS* 1991; 5: 145-51.
44. Chatterjee S, Johnson PR, Wong KK. Dual-target inhibition of HIV-1 *in vitro* by means of an adeno-associated virus antisense vector. *Science* 1992; 258: 1485-8.
45. Trono D, Feinberg MB, Baltimore D. HIV-1 Gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus. *Cell* 1989; 59: 113-20.
46. Smythe JA, Sun S, Thomson M, Markham PD, Reitz MS, Gallo RC, Lisziewicz J. A Rev-inducible mutant gag gene stably transferred into T lymphocytes : an approach to gene therapy against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 9: 3657-61.

## RÉFÉRENCES

47. Caruso M, Klatzmann D. Selective killing of CD4<sup>+</sup> cells harboring a human immunodeficiency virus-inducible suicide gene prevents viral spread in an infected cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 182-6.

48. Harrison GS, Long CJ, Curiel TJ, Maxwell F, Maxwell IH. Inhibition of human immunodeficiency virus-1 production resulting from transduction with a retrovirus containing an HIV-1 regulated diphtheria toxin A chain gene. *Hum Gene Ther* 1992; 3: 461-9.

49. Chen SY, Khouri Y, Bagley J, Marasco WA. Combined intra- and extracellular immunization against HIV-1 infection with a human anti-gp120 antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5932-6.

50. Schlienger K, Mancini M, Tiollais P, Michel M. Vaccination contre le SIDA: évaluation chez les primates. *médecine/sciences* 1995; 11: 985-93.

51. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB, Spector DH, Spector SA. HIV1 infection of human PBL-SCID mice. *Science* 1991; 251: 791-4.

52. McCune J, Kaneshima H, Krowka J, Namikawa R, Outzen H, Peault B, Rabin L, Shih CC, Yee E. The SCID-hu mouse: a small animal model for HIV infection and pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 399-429

53. Péault B, Weissman IL, Baum C, McCune JM, Tsukamoto A. Lymphoid reconstitution of the human fetal thymus in SCID mice with CD34<sup>+</sup> precursor cells. *J Exp Med* 1991; 174: 1283-6.

54. Desrosiers R. The simian immunodeficiency virus. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 557-78.

55. Dunbar EC, Emmons RVB. Gene transfer into hematopoietic progenitor and stem cells: progress and problems. *Stem Cells* 1994; 12: 563-76.

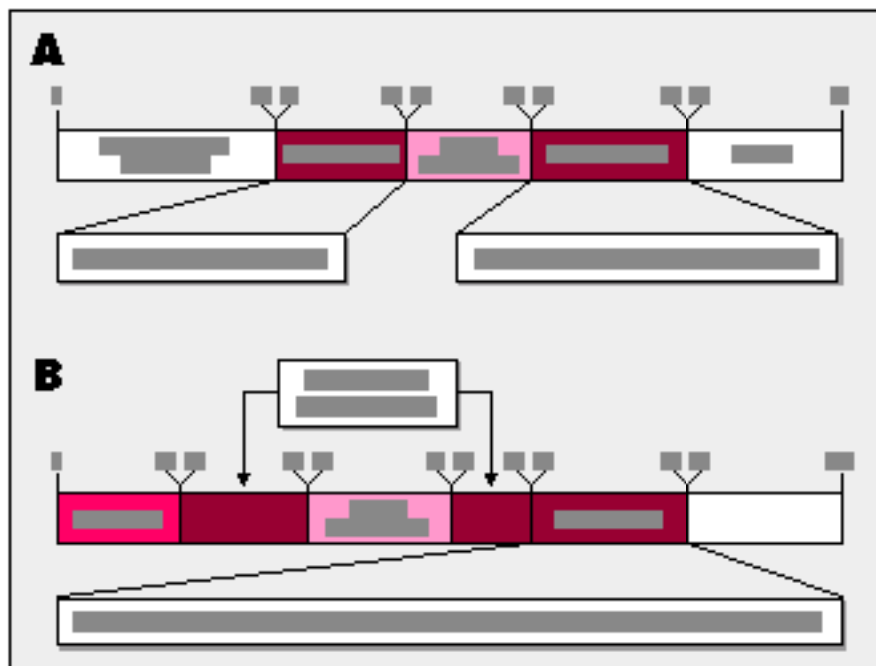


Figure 5. **Production d'inhibiteurs transdominants de TAT et REV.** La mutation systématique de chaque acide aminé des domaines de transactivation (domaines TA) des protéines TAT (A) et REV (B), et l'analyse *in vitro* des propriétés des variants ainsi produits permettent l'identification des acides aminés (lettres rouges) dont la mutation permet de créer des mutants inhibiteurs transdominants. Ces mutants ont perdu leur activité biologique mais sont capables d'inhiber *in trans* l'activité biologique de protéines TAT et REV non modifiées. Les domaines de localisation nucléaires (NLS), de fixation aux séquences ARN cibles (TAR et RRE) et de dimérisation/multimérisation sont également représentés.

production d'inhibiteurs transdominants (figure 5).

L'activité antivirale des mutants inhibiteurs transdominants a été démontrée *in vitro* par une analyse de la sensibilité au VIH-1 de lignées lymphocytaires exprimant de manière permanente les variants TAT et REV. Les équipes de B. Cullen à l'Institut médical Howard Hughes de Caroline du Nord, de G. Nabel à l'université du Michigan et de E. Bohlein de la société Progenesys (Palo Alto, CA, États-Unis) ont ainsi démontré que la production d'un variant bien défini, REV-M10 dont les acides aminés Leu et Glu en position 78 et 79 ont été respectivement modifiés en Asp et Leu (figure 5), pouvait conférer à différentes lignées de lymphocytes T humains une forte résistance à la réplication virale [23-25]. De manière similaire, l'expression de mutants TAT a également été associée à un

effet inhibiteur de la réplication de VIH-1 [26-28]. Nous avons entrepris pour notre part de comparer les propriétés antivirales respectives d'inhibiteurs de TAT et REV, et d'évaluer l'intérêt d'une association des deux mutants. Si nous avons effectivement également observé un effet antiviral significatif dans des clones cellulaires sélectionnés pour leur fort niveau d'expression du mutant TAT, aucune résistance à la réplication virale n'a été détectée dans une population cellulaire génétiquement modifiée non clonale. En revanche, une population de cellules T exprimant le mutant REV est initialement réfractaire au virus, avec cependant un échappement viral important trois semaines après le début de l'infection. De manière remarquable, l'expression simultanée des mutants TAT et REV inhibe presque totalement la réplication virale. Ces résultats



tats sont cependant légèrement différents de ceux du groupe de G. Nabel, car leur mutant *REV* confère seul un état antiviral aux cellules infectées par le vecteur, encourageant cette équipe à proposer et démarrer un essai clinique de phase I [29].

Bien qu'attrayante, une telle approche comporte de nombreuses limitations: (1) seule une co-expression des deux mutants *TAT* et *REV* permet, dans nos expériences, d'obtenir un état antiviral satisfaisant; or la production d'un vecteur rétroviral de titre élevé, capable d'exprimer simultanément les variants *TAT*, *REV* et un gène de sélection (exemple: gène de résistance à la néomycine) n'est pas chose aisée; (2) la résistance à la réplication virale des cellules co-exprimant les mutants *TAT* et *REV* n'est en fait possible que pour des doses virales relativement faibles, bien inférieures à celles utilisées pour les cellules portant les gènes *IFN* (voir ci-dessus); (3) malgré la mutation de leurs domaines d'activation, l'absence de toxicité de variants *TAT* et *REV* n'est pas établie: dans une étude antérieure, nous avons démontré que l'expression ubiquitaire des protéines *TAT* ou *REV* natives pouvait induire, chez des souris transgéniques, des manifestations pathologiques semblables à celles observées chez des patients sidéens [30]; il est donc important de s'assurer, avant tout développement clinique, que ces mutants sont dépourvus de ces propriétés; (4) les variants *TAT* et *REV* n'étant pas des protéines du soi, ils seront probablement reconnus par le système immunitaire des personnes traitées; bien qu'autologues, les cellules exprimant ces molécules risquent donc d'être rapidement rejetées. En conclusion, malgré son élégance, l'intérêt thérapeutique d'une telle stratégie reste très incertain, sinon controversé.

### **Production constitutive in vivo de molécules solubles antivirales**

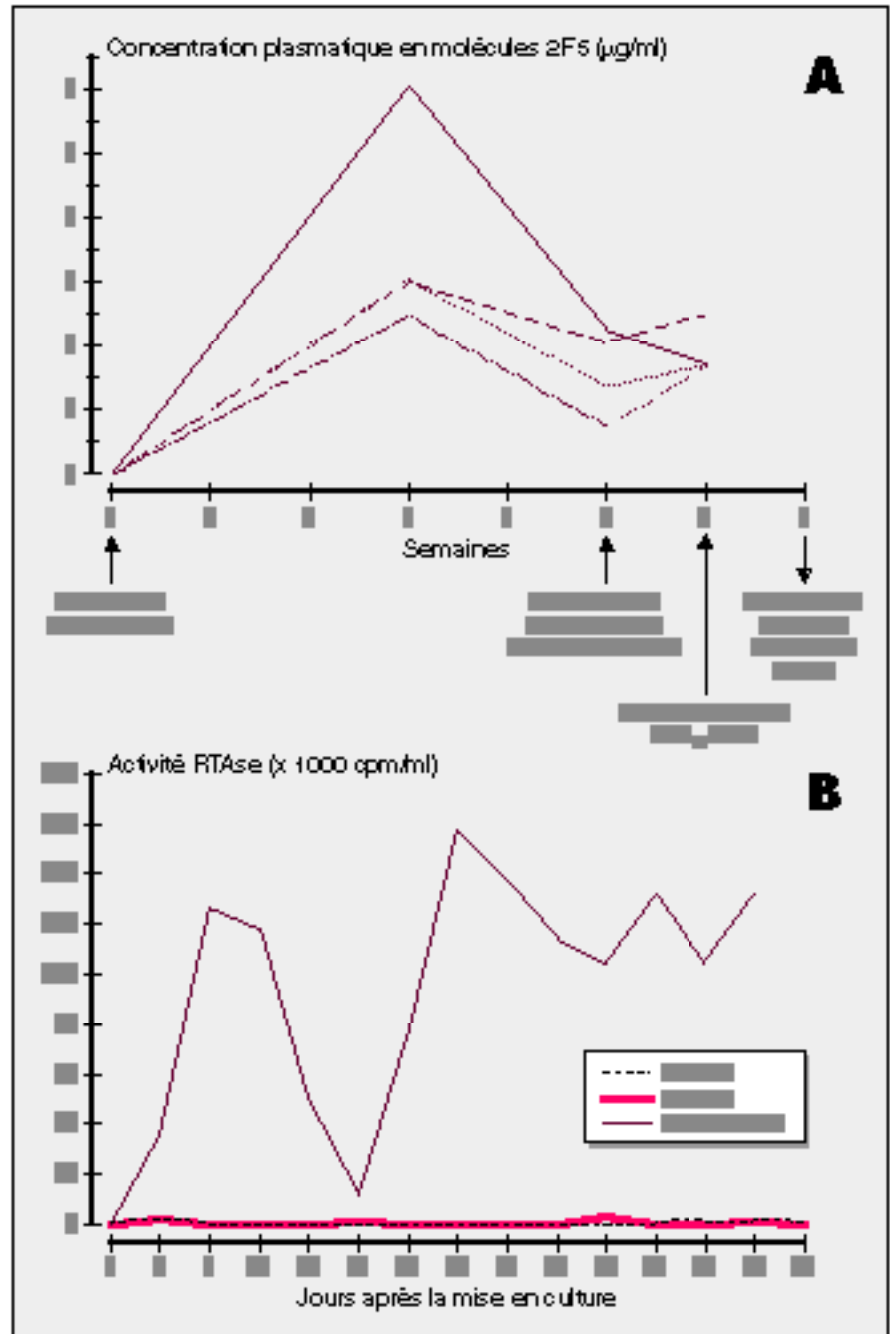
Plusieurs expériences avec des modèles simiens ont démontré la possibilité de protéger ces animaux contre une infection par le VIH-1, VIH-2 ou SIVsm par immunothérapie passive [31, 32]. Cependant, l'applica-

tion à l'homme de ce type d'approche est limitée par la nécessité de produire l'anticorps neutralisant ou l'immunotoxine à une échelle industrielle, et par le fait qu'un tel traitement nécessitera probablement des injections multiples. Ces limitations peuvent éventuellement être contournées par l'utilisation de la technologie des néo-organes [33] afin de délivrer de façon permanente des molécules solubles antivirales dans la circulation de patients séropositifs. Une molécule particulièrement intéressante est l'anticorps monoclonal 2F5 isolé par l'équipe du Pr H. Katinger (Institut d'immunologie appliquée, Vienne, Autriche). Cet anticorps d'origine humaine reconnaît un épitope très conservé de l'enveloppe virale, et possède un pouvoir de neutralisation virale de très large spectre [34-36]. Des néo-organes ont été, dans un premier temps, constitués selon la technique décrite par P. Moullier *et al.* [33], en utilisant des fibroblastes murins primaires autologues infectés par un vecteur rétroviral portant les ADNc codant pour les chaînes légère et lourde de l'anticorps 2F5. Dans ces premières expériences, malgré un transfert génétique très efficace dans des fibroblastes et une implantation et une vascularisation des néo-organes satisfaisantes, la concentration des anticorps humains circulants chez des souris *scid* immunodéficientes [37] n'a jamais dépassé quelques ng/ml de sang, ce qui est probablement insuffisant pour une neutralisation virale efficace. Afin de valider *in vivo* ce concept d'immunothérapie passive génétique, cette expérience a été répétée en utilisant, non pas des cellules autologues, mais la lignée fibroblastique murine NIH-3T3. Des néo-organes constitués de cellules 3T3 préalablement infectées *ex vivo* ont été implantés à des souris *scid* auxquelles  $40 \times 10^6$  cellules CD4<sup>+</sup> humaines ont été administrées par voie intrapéritonéale trois à cinq semaines après l'implantation; ces souris ont été éprouvées une semaine plus tard par injection intraveineuse, soit de l'isolat VIH-1<sub>LAI</sub>, soit de l'isolat VIH-1<sub>MN</sub>, et les cellules humaines ont été récupérées une semaine après pour analyse (figure 6A). Sur les vingt souris ainsi traitées et analysées, dix-huit se sont avérées contenir des cellules humaines qui avaient été protégées contre l'infec-

tion virale (figure 6B). Ces expériences suggèrent que des concentrations sériques d'anticorps 2F5 supérieures à 1µg/ml pourraient être capables de protéger *in vivo* des cellules humaines contre une épreuve virale.

Une telle approche comporte naturellement de nombreux inconvénients: ainsi que cela a été mentionné, la constitution de néo-organes contenant des fibroblastes primaires autologues infectés ne permet pas d'atteindre des niveaux circulants thérapeutiques; or il est évidemment exclu d'utiliser chez l'homme une lignée cellulaire établie, en raison du pouvoir tumorigène de celle-ci. De plus, la forte variabilité du virus aura probablement pour conséquence l'apparition de variants viraux résistants à cet anticorps; il sera donc nécessaire d'associer plusieurs molécules antivirales. Par ailleurs, il s'agit d'une technologie lourde, chirurgicalement invasive, et faisant intervenir de nombreux paramètres et composants biologiques difficiles à maîtriser à l'échelle industrielle (collagène, facteurs angiogéniques, cellules, gènes thérapeutiques...). Si l'évaluation d'une telle approche d'immunothérapie passive génétique doit être poursuivie en raison des résultats encourageants de cette étude préliminaire réalisée avec l'anticorps 2F5, ainsi que des récents travaux de Valère *et al.* démontrant une sécrétion de la molécule CD4 soluble dans la circulation sanguine de souris ayant reçu l'implantation de néo-organes modifiés génétiquement [38], il est important de tenter de simplifier la procédure. L'utilisation des vecteurs de transfert de gènes pouvant être directement administrés *in vivo* et permettre la production stable à forte concentration de protéines circulantes constituerait une alternative plus adaptée. De nouvelles générations de vecteurs adénoviraux à immunogénicité réduite sont actuellement en cours de développement par plusieurs équipes, dont la nôtre, et pourraient, dans un proche avenir, constituer une telle alternative [16]. Il sera également intéressant d'évaluer le pouvoir de synergie obtenu par la production simultanée de plusieurs molécules solubles antivirales affectant différentes étapes de la réplication virale.

Figure 6. **Production permanente in vivo de molécules solubles antivirales par implantation de fibroblastes génétiquement modifiés.** **A.** Des néo-organes constitués de fibroblastes 3T3-NIH infectés par un vecteur rétroviral portant les ADNc codant pour les chaînes lourde et légère d'un anticorps monoclonal humain neutralisant vis-à-vis du VIH-1 (anticorps 2F5) sont implantés dans la cavité intrapéritonéale de souris scid. Trois à cinq semaines après l'implantation, les cellules-cibles du VIH (cellules CEMA3) sont administrées par voie intrapéritonéale, puis une injection intraveineuse de 1000 TCID<sub>50</sub> VIH-1 (isolats Lai ou MN) est réalisée une semaine plus tard. Les cellules CEMA3 sont extraites de différents organes (rate, foie, tumeurs, ...) huit jours après l'épreuve et mises en culture pour une analyse détaillée de leur état viral. **B.** La réplication virale est régulièrement déterminée par la mesure de l'activité transcriptase inverse (RTAse) dans le surnageant cellulaire: les cellules issues de la souris n'ayant pas reçu l'implantation (témoin) peuvent être infectées par le VIH-1, alors que les cellules issues de 18 souris ayant reçu l'implantation du néo-organe (sur 20 animaux testés) sont protégées contre une infection in vivo (les cellules isolées de la rate de deux souris sont présentées).



### Autres cibles moléculaires de thérapie génique

Plusieurs autres stratégies de thérapie génique du SIDA sont également l'objet d'une intense investigation par de nombreuses équipes (figure 2). Parmi ces stratégies, certaines présentent

des avantages particuliers. Ainsi, les transferts de gènes codant, soit pour des ribozymes anti-VIH-1, soit pour des leurres TAR et RRE, sont capables de conférer une résistance cellulaire significative à l'infection virale [31-33]. 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 du rejet immunologique des cellules infectées. Les ribozymes en cours d'évaluation sont dirigés pour la plupart contre le gène *gag* ou contre la région 5' non codante du transcrit viral. La dégradation des ARN viraux a ici l'avantage d'interférer, tant avec

des étapes précoces du cycle viral, par clivage de l'ARN viral génomique, qu'avec des étapes plus tardives, par dégradation des ARN néosynthétisés. L'activité catalytique des ribozymes permet, en outre, de diminuer les concentrations intracellulaires requises pour une activité optimale de ces molécules.

A l'opposé, bien qu'également fondée sur l'utilisation d'acides nucléiques, l'expression intracellulaire d'ARN antisens dirigés contre les gènes *TAT*, *REV*, *ENV*, la séquence TAR ou le signal d'encapsulation virale Psi paraît moins intéressante en raison des niveaux d'expression très élevés requis pour une répression virale efficace [42-44].

Quant aux inhibiteurs GAG transdominants [45, 46], dont l'expression intracellulaire permet d'interférer en *trans* avec la néoformation de virions infectieux, les limitations sont relativement proches de celles décrites précédemment pour les inhibiteurs transdominants TAT et REV. Bien qu'une action antivirale intéressante ait été associée aux mutants décrits, il s'agit de molécules d'origine virale caractérisées par la présence de nombreux épitopes immunodominants, dont l'expression intracellulaire entraînera probablement *in vivo* le rejet des cellules infectées.

Une des premières stratégies proposées pour un traitement du SIDA par thérapie génique est l'introduction dans les cellules cibles du VIH d'un programme génétique de « suicide » induit par l'infection virale [47, 48]. Cette approche consiste à modifier les cellules hématopoïétiques de manière que l'infection par VIH-1 induise la synthèse d'une protéine toxique (conditionnelle ou non) entraînant la mort de la cellule avant toute production de nouvelles particules virales. Une population cellulaire génétiquement modifiée devrait donc être globalement résistante, non pas à la primo-infection, mais à la propagation virale. Bien que le concept soit séduisant, et que son principe ait été démontré *in vitro* [47, 48], son application ne peut être sérieusement envisagée en raison de la nécessité d'infecter un très large pourcentage (voire 100 %) de la population cellulaire cible pour espérer la protéger. En effet, la cinétique du VIH-1 est telle [6] que l'infection

productrice d'une fraction faible de cellules CD4<sup>+</sup> non infectées devrait suffire à engendrer une charge virale capable de détruire l'ensemble des cellules génétiquement modifiées. La dynamique rapide des virus et des cellules infectées suggère que seules des cellules disposant d'un avantage sélectif par rapport aux cellules infectées devraient pouvoir survivre et proliférer.

Une stratégie plus récente consistant à synthétiser de manière intracellulaire un anticorps simple-chaîne dirigé contre une protéine virale régulatrice ou structurale semble être une voie plus prometteuse, tant en raison de son apparente efficacité antivirale, que de la possibilité d'humaniser ces anticorps afin de réduire leur immunogénicité potentielle [49]. Il reste néanmoins difficile de comparer l'efficacité et les avantages respectifs de cette stratégie par rapport aux autres, chaque laboratoire utilisant des réactifs (isolats viraux, cellules...) non standardisés. De plus, aucune donnée *in vivo* n'est actuellement disponible pour la majorité de ces approches. C'est pourquoi nous avons, pour notre part, choisi de développer et d'évaluer, en parallèle, dans un même laboratoire, plusieurs stratégies de thérapie génique, évaluation dont il ressort que le transfert de gènes *IFN* inductibles par TAT est probablement aujourd'hui la voie la plus prometteuse.

## Modèles animaux

Le chimpanzé est à ce jour le seul animal sensible à l'infection par le VIH-1 [50], mais son prix, son statut d'animal protégé et l'absence de développement de signes cliniques limitent son utilisation pour l'évaluation de protocoles de thérapie génique. C'est pourquoi, malgré des insuffisances évidentes, les souris immunodéficientes *scid* humanisées par injection de lignées cellulaires humaines, de lymphocytes humains primaires [51] ou par réimplantation de tissus fœtaux humains [52] constituent un modèle animal à considérer avec attention dans le cadre d'une évaluation préclinique. Nous avons pu confirmer dans ce modèle la résistance *in vivo* des lignées cellulaires portant les gènes *IFN* inductibles par TAT ou expri-

mant simultanément les inhibiteurs transdominants de *TAT* et *REV*. Cependant, la souris *scid* étant ici utilisée comme simple « tube à essai », ce modèle ne reproduit en aucun cas un environnement biologique semblable à celui des patients séropositifs. En revanche, la reconstitution hématopoïétique de souris *scid* par greffe de fragments thymiques fœtaux humains et administration de cellules souches humaines génétiquement modifiées, d'après le modèle de Péault *et al.* [53], constituerait une amélioration notable du système. Néanmoins, le meilleur modèle préclinique du SIDA reste probablement l'infection du macaque par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) [50, 54]. Contrairement au VIH-1 chez le chimpanzé, SIVmac peut induire une maladie très proche du SIDA dans des délais compatibles avec l'étude expérimentale. En outre, de nombreux clones moléculaires et biologiques correspondant à plusieurs isolats viraux sont disponibles, le macaque est d'un coût bien plus modéré que le chimpanzé, et l'espèce n'est pas en danger. Par ailleurs, l'utilisation intensive de ce modèle animal pour de nombreuses études vaccinales permet aujourd'hui de disposer de nombreux réactifs biologiques. Nul doute que malgré la lourdeur de ce modèle, de nombreuses équipes impliquées dans le développement de stratégies de thérapie génique du SIDA seront progressivement amenées à s'y intéresser. Nous avons pour notre part démontré, dans le cadre de la préparation d'un protocole clinique, que des lymphocytes CD4<sup>+</sup> de macaque pouvaient être efficacement purifiés, cultivés, infectés par les vecteurs rétroviraux portant les gènes *IFN* humains décrits précédemment, et réadministrés de manière autologue aux animaux. Nous avons ainsi pu observer la persistance *in vivo* des cellules infectées durant plus de six mois.

## Évaluation clinique

Les rares équipes en position de proposer aujourd'hui un protocole clinique de thérapie génique du SIDA ont donc choisi de se focaliser dans un premier temps sur l'infection par un vecteur et la réadministration

autologue des lymphocytes CD4<sup>+</sup>. Le seul protocole aujourd'hui en cours est celui de G. Nabel aux États-Unis, dans lequel un gène codant pour un inhibiteur transdominant de REV a été transféré à des lymphocytes CD4<sup>+</sup> isolés de patients infectés [29]. D'autres protocoles américains ont été proposés et approuvés par les commissions de réglementation mais n'ont pas encore débuté [39, 49]. Nous préparons, pour notre part, un essai clinique de phase I dans lequel nous procéderons à l'administration autologue de lymphocytes CD4<sup>+</sup> génétiquement modifiés par transfert rétroviral des gènes *IFN $\alpha$*  et  $\beta$  humains à expression inductible par TAT. Le but de ce protocole sera, avant tout, d'évaluer sa sécurité et sa faisabilité, et de déterminer la survie *in vivo* des cellules infectées. Bien qu'aucun bénéfice thérapeutique ne soit attendu d'un tel protocole, les informations recueillies seront précieuses pour la préparation d'un essai futur dans lequel les cellules souches hématopoïétiques, et non plus des lymphocytes CD4<sup>+</sup> périphériques, seront infectées *ex vivo* et administrées aux patients. Étant donné leur capacité d'autorenouvellement et de différenciation en cellules hématopoïétiques mûres, les cellules souches constituent évidemment les cibles privilégiées pour une thérapie génique du SIDA. Cependant, malgré des progrès récents indéniables, la manipulation génétique des cellules souches hématopoïétiques humaines est encore mal maîtrisée [55]. Tant que les conditions requises pour une culture et une infection optimale de ces cellules n'auront pas été établies, un tel protocole clinique sera difficile à mettre en place. Par ailleurs, l'impact réel de la maladie sur ces cellules souches reste peu compris et doit être mieux défini.

En 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 des souris *scid* humanisées ou, mieux, chez des macaques, sont aujourd'hui encore limitées voire souvent inexistantes ■

## Summary

### Gene therapy for infectious diseases: the AIDS model

Gene therapy could be used to introduce either a functional copy of an altered endogenous gene into the target tissue or a foreign gene coding for a protein with anti-viral or anti-neoplastic properties. The absence of efficient therapeutic drugs makes AIDS one obvious candidate among the infectious diseases which might be treated by gene therapy. Since HIV predominantly infects cells of the hematopoietic system, pluripotent stem cells constitute potential targets for the introduction of foreign anti-HIV genes. Reimplantation of the genetically modified stem cells into AIDS patients should theoretically allow the repopulation of the host with mature CD4<sup>+</sup> cell populations expressing novel molecules that might interfere with viral replication and slow the progression of the disease. Identification of efficient and safe antiviral genes is therefore a critical issue in the successful development of an AIDS gene therapy protocol. Given the molecular complexity of HIV replication, it is important not to focus on a single antiviral gene therapy strategy but to test in parallel, both *in vitro* and *in vivo*, several approaches aimed at targeting multiple independent steps of the viral replication cycle. While some of these strategies proved relatively efficient *in vitro*, and several phase I clinical trials have already been proposed, evidence for *in vivo* efficacy is still lacking for most of the approaches. This review describes the AIDS gene therapy strategies currently under evaluation in various laboratories, with a particular focus on their respective advantages and limitations.

### Remerciements

Ces travaux ont été en partie soutenus par l'Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS).

### TIRÉS À PART

M. Mehtali.

Colloque GERM (SFBBM)  
Groupe d'Études  
des Régulations Métaboliques  
de la Société Française  
de Biochimie  
et Biologie Moléculaire  
17-18 SEPTEMBRE 1996  
Université de Bourgogne  
Faculté des Sciences Mirande  
DIJON, FRANCE

PPAR, nutriments et xénobiotiques:  
médiateurs  
de la régulation cellulaire?

N. Latruffe, organisateur (Dijon)

### THÈMES

- Rôle régulateur des récepteurs nucléaires de la sous-famille des PPAR
- Régulation des gènes par les nutriments (lipides, glucides...)
- Proliférateurs de peroxyosomes naturels et synthétiques

### AVEC LA PARTICIPATION DE

F.J. Gonzales (NIH, Bethesda)  
J.A. Gustafsson (Karolinska, Stockholm)  
A. Kahn (Cochin, Paris)  
B. Spiegelman (Harvard, Boston)

+  
Communications orales sélectionnées  
+  
Session d'affiches (remise d'un prix)

### AVEC LE CONCOURS DU COMITÉ SCIENTIFIQUE

P. Clouet (Dijon)  
M. Dauca (Nancy)  
J. Girard (Meudon)  
A. Lavoigne (Rouen)  
J.P. Leroux (Paris)

### Renseignements

N. Latruffe, organisateur

### Inscriptions

M.C. Clemencet  
LBMC,  
Faculté des Sciences Mirande  
B.P. 138 - 21004 DIJON

Tél.: 80.39.62.39  
Fax: 80.39.62.50

e.m.: la.truffe@satie.u-bourgogne.fr

Date limite d'inscription  
et d'envoi des résumés  
30 mai 1996