

Thérapie génique de la mucoviscidose par transfert adénoviral du gène CFTR⁽¹⁾

Andrea Pavirani
Christian Schatz
Majid Mehtali

Du fait de sa fréquence et de sa gravité, la mucoviscidose a été une des premières maladies héréditaires pour laquelle on ait envisagé la thérapie génique. Elle est caractérisée par l'inactivation de la protéine *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR). La morbidité étant essentiellement liée aux complications pulmonaires, la première cible thérapeutique est l'épithélium pulmonaire dont les anomalies électrophysiologiques disparaissent lorsque le gène *CFTR* est transféré. La première génération d'adénovirus recombinants (dont le gène *E1* est délété) a été utilisée comme vecteur du gène *CFTR*. De nombreux modèles animaux ont vu le jour ; on a appris à mieux apporter le vecteur dans les voies respiratoires (aérosolisation) ; on a, surtout, découvert les gros problèmes immunologiques suscités par ces vecteurs. L'étude de faisabilité n'est pas terminée ; l'expérience accumulée et la meilleure connaissance de la biologie de l'adénovirus permettent aujourd'hui d'envisager la construction de vecteurs adénoviraux « minimaux », dont le génome viral résiduel devrait être silencieux, et qui devraient donc se révéler moins cytopathiques et immunogéniques.

La mucoviscidose ou fibrose kystique est la maladie génétique à potentialité létale la plus fréquente chez les individus d'origine caucasienne. De transmission autosomique récessive, elle affecte en moyenne un nouveau-né sur 2500 [1]. Malgré les progrès constants réalisés ces dernières années dans la qualité de la prise en charge des patients et dans l'amélioration des traitements disponibles, la mucoviscidose reste une maladie mortelle une fois sur deux avant l'âge de 30 ans. Les cibles de la maladie sont la trachée, le poumon, les glandes sudoripares, le pancréas, le

foie et le côlon, mais les manifestations cliniques sont dominées par les atteintes bronchopulmonaires, responsables de plus de 95 % des décès. Le gène dont la déficience est responsable de la maladie a été identifié et séquencé en 1989, permettant ainsi de prédire la structure de la protéine correspondante (*m/s* n° 8, vol. 5, p. 589) [2, 3]. Il s'agit d'un gène long d'environ 250 kpb et transcrit sous forme d'un ARNm de 6,45 kb. Des études de modélisation moléculaire de la protéine, appelée depuis *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), ont révélé des caractéristiques semblables à celles d'une

ADRESSE

A. Pavirani: directeur scientifique adjoint.
C. Schatz: directeur médical. M. Mehtali: chef du département de thérapie génique. Transgène SA, 11, rue de Molsheim, 67082 Strasbourg Cedex, France.

(1) 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.

RÉFÉRENCES

1. Boat TF, Welsh MJ, Beudet AL. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill Inc, 1989; 2649-80.
 2. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245 : 1059-65.
 3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245 : 1066-73.
 4. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992; 256 : 774-9.
 5. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73 : 1251-4.
 6. Puchelle E. CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*): une protéine à multiples fonctions. *médecines/sciences* 1994; 10 : 627-9.
 7. Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM. Correction of the cystic fibrosis defect *in vitro* by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 1990; 62 : 1227-33.
 8. Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, McCann JD, Klinger KW, Smith AE, Welsh MJ. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 1990; 347 : 1066-73.
 9. Rosenstein BJ, Flotte TR. New directions in treatment. In: Dodge JA, Brock DJH, Widdicombe JH, eds. *cystic fibrosis, current topics*. Chichester: J. Wiley and Sons, 1992; 269-301.
 10. Horwitz MS. Adenoviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, eds. *Virology*. New York: Raven Press, 1990: 1679-721.
- protéine de transport membranaire; cette protéine est en effet constituée d'une région extracellulaire courte, d'une région membranaire formant un canal ionique potentiel et d'une région intracellulaire possédant deux zones de fixation pour l'ATP et une zone probablement régulatrice, portant de nombreux sites de phosphorylation. Cette hypothèse a depuis été confirmée expérimentalement, la protéine CFTR s'étant avérée être un canal pour l'ion chlorure (Cl⁻) [4, 5]. La découverte du gène a également permis de démontrer qu'une délétion affectant la phénylalanine localisée en position 508 sur le premier domaine de fixation de l'ATP est responsable de la majorité (70 %) des cas de mucoviscidose. Une protéine CFTR non fonctionnelle a pour conséquence une absence ou une diminution du transport des ions Cl⁻ après stimulation par l'AMPc, et une altération du transport cellulaire des molécules d'eau et des ions sodium (Na⁺) [4, 5]. D'autres fonctions de la protéine CFTR ne sont cependant pas à exclure, des études récentes ayant démontré un rôle de cette protéine dans la formation de pores multi-ioniques perméables à plusieurs anions, dans l'endo/exocytose de molécules, dans la régulation du pH intracellulaire et la régulation du volume cellulaire [6].
- Les progrès indéniables réalisés dans la qualité de la prise en charge des malades ne peut faire oublier le caractère létal de la mucoviscidose et l'absence de traitements efficaces. La recherche de nouvelles thérapies est donc une priorité: des études préliminaires ayant démontré *in vitro* que le transfert du gène *CFTR* normal dans des cellules issues de patients atteints de mucoviscidose corrige leur transport ionique, la thérapie génique constitue une voie thérapeutique alternative [7-9].
- L'adénovirus, un vecteur privilégié pour un transfert *in vivo* du gène CFTR ?**
- La nature des tissus cibles de la maladie exclut une thérapie génique *ex vivo* dans laquelle les cellules pulmonaires du patient seraient prélevées, génétiquement modifiées au laboratoire et réadministrées aux patients.
- En conséquence, seul un traitement *in vivo* consistant en un transfert direct du gène *CFTR* dans les cellules pulmonaires peut être considéré. Cela impose de disposer d'un vecteur capable d'assurer efficacement et en toute sécurité un tel transfert génétique *in vivo*, et a conduit plusieurs équipes en France et aux États-Unis à s'intéresser à l'adénovirus [10]. Plusieurs caractéristiques biologiques de cette classe de virus en font en effet un outil *a priori* particulièrement bien adapté à une telle application [11, 12]: (1) les adénovirus possèdent un tropisme naturel pour les voies respiratoires; (2) contrairement aux rétrovirus, ils peuvent infecter très efficacement des cellules quiescentes ou se divisant faiblement; (3) les manifestations cliniques associées à une infection adénovirale naturelle sont généralement bénignes; (4) dans le cadre de vaccinations de recrues militaires, des adénovirus vivants non modifiés ont été administrés à des millions d'Américains sans complications majeures; (5) des vecteurs recombinants non répliquatifs et de titres élevés, portant et exprimant des gènes hétérologues, peuvent être dérivés des adénovirus humains de type 2 et 5.
- Les vecteurs adénoviraux recombinants, actuellement disponibles, sont des virus dans lesquels la majorité de la région virale *E1* essentielle à la réplication a été délétée et remplacée par une cassette d'expression contenant le gène thérapeutique [11, 12]. Ces vecteurs sont également souvent délétés de la région virale *E3* dont la fonction est d'assurer *in vivo* une atténuation de la réponse immunitaire de l'hôte mais dont l'absence n'est pas un handicap pour la réplication virale *in vitro* [13]. Cette délétion de *E3* permet ainsi l'introduction de séquences exogènes de plus grande taille. De tels vecteurs ne peuvent en conséquence se répliquer que dans des cellules de complémentarité dans lesquelles les fonctions virales délétées (exemple: *E1*) sont fournies *in trans*. Des vecteurs délétés des régions virales *E1* et éventuellement *E3*, et contenant l'ADNc

* Cependant, la fonction réelle du canal CFTR a été réévaluée récemment (voir m/s n° 11, vol. 11, p. 1612).

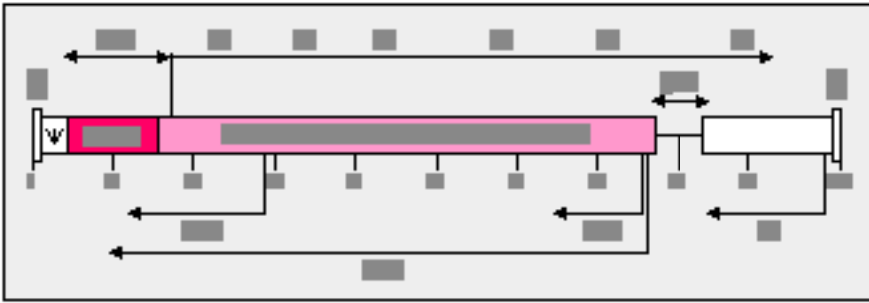


Figure 1. **Structure schématique du vecteur AdCFTR.** Le génome adénoviral est subdivisé en régions génétiques exprimées, soit précocement durant le cycle viral et codant pour des protéines régulatrices (régions early E1 à E4), soit après la réplication virale et codant pour des protéines structurales (régions late L0 à L5). Le vecteur AdCFTR est construit par délétion des régions E1 et E3, et insertion de la cassette d'expression de l'ADNc CFTR humain en lieu et place de E1. Un tel vecteur ne pourra en conséquence se répliquer que dans une cellule de complémentation fournissant en trans les protéines E1.

CFTR sous le contrôle de séquences promotrices hétérologues (AdCFTR) ont ainsi été mis au point par plusieurs équipes françaises et américaines (figure 1), et leurs propriétés évaluées *in vitro* et *in vivo* [14-17].

Les études *in vitro* ont démontré que ces vecteurs AdCFTR permettent effectivement une transduction efficace de cellules pulmonaires isolées de patients et l'obtention d'une forte expression d'une protéine CFTR fonctionnelle, avec pour conséquence la correction des anomalies de transport ionique [17]. Une observation importante issue de ces évaluations *in vitro* a été la démonstration que la transduction de la totalité de la population cellulaire n'était pas indispensable pour une correction satisfaisante du défaut physiologique; la modification génétique d'environ 10 % des cellules totales s'avère en effet suffisante (*m/s n° 10, vol. 8, p. 1119*) [18]. Ces résultats très encourageants ne permettent cependant pas de pronostiquer une quelconque efficacité *in vivo*: la nature précise des cellules à transduire [19], la persistance de l'expression du gène CFTR transféré, les conséquences de possibles réponses immunitaires dirigées contre le vecteur et la toxicité des procédés mis en œuvre sont des paramètres importants qui ne peuvent évidemment être étudiés que *in vivo*. L'absence de modèles animaux développant naturellement la mucoviscidose impose de réaliser

ces évaluations précliniques dans divers modèles animaux relativement imparfaits mais permettant néanmoins d'étudier certains des paramètres cités.

Évaluation préclinique

Rat des cotonniers

Parmi les modèles animaux disponibles, le rat des cotonniers possède l'avantage d'être peu coûteux et de petite taille, donc facilement manipulable; de plus, le rat des cotonniers est permissif à l'infection par plusieurs sérotypes d'adénovirus humains (Ad1, Ad2, Ad5 et Ad6) et développe une affection pulmonaire consécutive à l'infection virale relativement semblable à celle observée chez l'homme [20], ce qui permet une évaluation de la toxicité potentielle des vecteurs adénoviraux. Dès 1992, l'équipe de R. Crystal (NIH, Bethesda, MD, USA), en collaboration avec l'équipe de M. Perricaudet (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) et nous-mêmes avons démontré qu'une instillation du vecteur AdCFTR dans les voies respiratoires de rats des cotonniers permettait une expression détectable des ARNm et une synthèse de la protéine CFTR pendant respectivement 6 semaines et 11-14 jours [15]. Une étude complémentaire réalisée avec un vecteur adénoviral de structure semblable mais portant le gène mar-

queur β -galactosidase d'*E. coli* (β gal) a confirmé la capacité du vecteur de transduire efficacement une majorité des types cellulaires pulmonaires dont, notamment, les cellules basales, les cellules non différenciées, les cellules ciliées et les cellules sécrétrices [21]. Ces données confirment les potentialités importantes des vecteurs adénoviraux pour le transfert direct d'un gène thérapeutique dans les tissus cibles de la mucoviscidose. Mais les limites du modèle animal utilisé ne permettent cependant pas de déterminer si ce transfert d'un gène CFTR fonctionnel pourrait effectivement corriger la maladie.

Souris transgéniques dont le gène CFTR endogène est inactivé par recombinaison homologue

Disposer d'un modèle animal développant la maladie est essentiel pour l'évaluation de nouveaux médicaments ou de protocoles de thérapie génique, mais aussi pour une étude détaillée de la physiopathologie de la mucoviscidose. Cette carence en modèles animaux satisfaisants a stimulé plusieurs équipes à tenter de produire des souris transgéniques dont les deux allèles endogènes du gène CFTR murin auraient été spécifiquement inactivés par recombinaison homologue [22]. Bien que pour des raisons mal définies l'inactivation du gène CFTR murin se soit avérée difficile et très peu efficace, quatre groupes ont néanmoins réussi à produire des souris dans lesquelles l'expression du gène CFTR endogène est, soit très fortement réduite (*m/s n° 8, vol. 8, p. 879*) [23], soit complètement abolie (*m/s n° 7, vol. 8, p. 653*) [24-26]. Ces animaux développent rapidement des troubles gastro-intestinaux semblables à ceux décrits chez l'homme, mais la sévérité de ces désordres dépend du niveau d'expression du gène CFTR: si les souris n'expriment plus le gène endogène ne survivent que quelques jours en raison d'une obstruction intestinale complète, ces désordres sont bien moins prononcés chez les souris dont le gène CFTR conserve une activité résiduelle [23]. Les tissus pulmonaires de ces souris ne présentent au contraire aucune anomalie évidente, malgré une déficience du transport de l'ion Cl⁻ consécutive à l'altération

RÉFÉRENCES

11. Graham FL, Prevec L. Manipulation of adenovirus vectors. In: Murray EJ, ed. *Methods of molecular biology*, vol. 7. Clifton: The Humana Press Inc, 1991 : 109-28.
 12. Trapnell BC. Adenoviral vectors for gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 1993 ; 12 : 185-99.
 13. Wold WSM, Tollefson AE, Hermiston TW. Strategies of immune modulation by adenoviruses. In: McFadden G, ed. *Viroceptors, virokines and related immune modulators encoded by DNA viruses*. New York: RG Landes Company, 1994: 147-85.
 14. Rich DP, Couture LA, Cardoza LM, Guiggio VM, Armentano D, Espino PC, Hehir K, Welsh MJ, Smith AE, Grefory RJ. Development and analysis of recombinant adenoviruses for gene therapy of cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 1993 ; 4 : 461-76.
 15. Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, Fukayama M, Bargon J, Stier LE, Stratford-Perricaudet L, Perricaudet M, Guggino WB, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. *In vivo* transfer of the human *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* gene to the airway epithelium. *Cell* 1992 ; 68 : 143-55.
 16. Mittereder N, Soopin Y, Bachurski C, Cuppoletti J, Whitsett JA, Toltoshev P, Trapnell BC. Evaluation of the efficacy and safety of *in vitro*, adenovirus-mediated transfer of the human *CFTR* cDNA. *Hum Gene Ther* 1994 ; 5 : 717-29.
 17. Zabner J, Couture LA, Smith AE, Welsh MJ. Correction of cAMP-stimulated fluid secretion in cystic fibrosis airway epithelia: efficiency of adenovirus-mediated gene transfer *in vitro*. *Hum Gene Ther* 1994 ; 5 : 585-93.
 18. Johnson LG, Olsen JC, Sarkadi B, Moore KL, Swanstrom R, Boucher RC. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nature Genet* 1992 ; 2 : 21-5.
 19. Merten M, Becq F. Mucoviscidose : vers quelles cellules pulmonaires faut-il orienter la recherche fondamentale et clinique ? *médecine/sciences* 1995 ; 11 : 1442-6.
 20. Prince GA, Porter DD, Jenson AB, Horswood RL, Chanock RM, Ginsberg HA. Pathogenesis of adenovirus type 5 pneumonia in cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *J Virol* 1993 ; 67 : 101-11.
- du gène *CFTR* murin. Il est cependant intéressant d'observer que les souris mutantes dont la survie est plus prolongée en raison d'une expression résiduelle du gène *CFTR* endogène [23] développent plus fréquemment des lésions pulmonaires à la suite d'infections bactériennes expérimentales que des souris normales [27]. Plus récemment, on a produit une lignée de souris dont le gène *CFTR* est spécifiquement délété du codon Phe508, reproduisant ainsi fidèlement la mutation majoritairement observée chez les patients atteints de mucoviscidose [28]. Le phénotype de ces souris est semblable à celui des souris dont le gène *CFTR* est totalement inactivé, et ne reproduit donc que partiellement la maladie humaine. Ces souris ne constituent donc pas un vrai modèle animal de la mucoviscidose, mais elles sont néanmoins très utiles pour une évaluation de la capacité des vecteurs de transfert génétique de corriger *in vivo* le défaut de transport ionique des cellules épithéliales pulmonaires. Ainsi, une première série d'expériences a démontré que l'administration du gène *CFTR* humain associé à des lipides cationiques permet une restauration électrophysiologique totale ou partielle dans les voies pulmonaires des animaux traités (*m/s n° 3*, vol. 9, p. 348) [29, 30]. Ces données, associées à l'absence de toxicité des lipides utilisés, ont conduit ces investigateurs à proposer et commencer un essai clinique de phase I [31]. De manière semblable, l'équipe de R. Boucher à Chapel Hill (NC, USA) a démontré dans ce modèle murin qu'un transfert adénoviral du gène *CFTR* humain permet également une correction du transport en ions Cl⁻ [32]. Mais cette correction physiologique n'est que partielle, en raison apparemment d'une très faible susceptibilité *in vivo* des cellules épithéliales murines à l'infection adénovirale. Cependant, cette dernière observation est en contradiction avec d'autres travaux [21] et doit être confirmée.

Singe Rhesus et babouins

Contrairement à celle de la souris, la structure du tractus trachéobronchique du macaque et du babouin est très semblable à celle de l'homme.

En outre, comme chez l'homme, la protéine CFTR simienne est localisée à la surface membranaire apicale des cellules ciliées, et la fréquence de battement de ces cils est identique à celle des cils humains [33]. Bien que ne développant pas la maladie, ces animaux constituent néanmoins un modèle préclinique intéressant pour démontrer la faisabilité du transfert du gène *CFTR* et l'étude détaillée des conséquences d'une telle manipulation. Plusieurs travaux indépendants, dans lesquels le vecteur AdCFTR a été administré aux singes par instillation nasale ou trachéo-bronchique, ont été récemment publiés [34-40]. Ces études ont permis de préciser : (1) la durée de persistance de l'ADN viral ; (2) la longévité de l'expression du gène *CFTR* transféré ; (3) les risques de dissémination du virus dans les autres tissus de l'animal, et plus particulièrement les cellules germinales ; (4) les risques de dissémination du virus recombinant dans l'environnement ; (5) les conséquences biochimiques, biologiques, immunologiques et les éventuelles toxicités associées à l'administration *in vivo* du vecteur.

Ainsi, dans une étude réalisée en collaboration avec l'équipe de D. Valerio (IntroGène, Rijswijk, Université de Leiden, Pays-Bas) et incluant vingt-cinq macaques [34, 37, 38, 41], nous avons traité, soit par instillation bronchoscopique, soit par nébulisation, respectivement quinze et quatre macaques par des vecteurs AdCFTR ou Adβgal ; six animaux témoins n'ont reçu que le milieu de transport du vecteur. Les doses virales utilisées dans cette étude varient de $1,5 \times 10^7$ ufp (unité de formation de plages) à $1,7 \times 10^{11}$ ufp. Quatre singes ont, en outre, reçu une double administration virale. Les animaux ont été sacrifiés pour analyse entre 2 et 128 jours après l'injection du vecteur. Bien que permettant une administration relativement efficace du vecteur recombinant, l'instillation bronchoscopique est une procédure relativement agressive et peut créer des lésions dans l'épithélium pulmonaire. C'est pourquoi un procédé permettant une nébulisation directe du vecteur AdCFTR a été mis au point et évalué en parallèle. Ce procédé devrait également favoriser une meilleure distribution du vecteur dans les cellules

RÉFÉRENCES

21. Mastrangeli A, Danel C, Rosenfeld MA, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Pavirani A, Lecoq JP, Crystal RG. Diversity of airway epithelial cell targets for *in vivo* recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *J Clin Invest* 1993; 91: 225-34.
22. Babinet C. Les cellules souches embryonnaires de souris: une voie privilégiée de transformation génétique à l'échelle de l'animal. *médecine/sciences* 1992; 8: 268-75.
23. Dorin JR, Dickinson P, Alton EFWF, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimber WL, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML, Anderson L, Beddington RSP, Porteous DJ. Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* 1992; 359: 211-5.
24. Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, Koller BH. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* 1992; 257: 1083-8.
25. Ratcliff R, Evans MJ, Doran J, Cuthbert AW, McVinish LJ, Foster D, Anderson JR, Colledge WH. Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting. *Nature Genet* 1993; 4: 35-41.
26. O'Neal WK, Hasty P, McCray PB, Casey B, Rivera-Perez J, Welsh MJ, Beaudet AL, Bradley A. A severe phenotype in mice with a duplication of exon 3 in the cystic fibrosis locus. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1561-9.
27. Davison DJ, Dorin JR, McLachlan G, Rinaldi V, Lamb D, Doherty C, Govan J, Porteous DJ. Lung disease in the cystic fibrosis mouse exposed to bacterial pathogens. *Nature Genet* 1995; 9: 351-7.
28. Colledge WH, Abella BS, Southern KW, Ratcliff R, Jiang C, Cheng SH, McVinish LJ, Anderson JR, Cuthbert AW, Evans MJ. Generation and characterization of a deltaF508 cystic fibrosis mouse model. *Nature Genet* 1995; 19: 445-52.
29. Hyde SC, Gill DR, Higgins CF, Trezise AEO, McVinish LJ, Cuthbert AW, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH. Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy. *Nature* 1993; 362: 250-5.

cibles du patient. Nous avons utilisé pour cette étude le nébuliseur Opti-neb® (société Air Liquide, Paris) en raison de sa capacité de produire durant une période déterminée l'aérosolisation synchronisée d'une substance thérapeutique. Cette administration par aérosol est en effet restreinte ici à la phase d'inspiration, un embout buccal étant appliqué aux animaux afin de s'assurer que ceux-ci inspirent effectivement les doses désirées, et la durée de nébulisation durant chaque inspiration peut être aisément contrôlée. La dose virale totale administrée sera donc définie par le nombre d'inspirations et les risques de perte de matériel recombinant par dissémination dans l'environnement seront théoriquement fortement réduits.

Cette étude *in vivo* confirme les travaux antérieurs réalisés chez le rat des cotonniers: (1) l'ADN viral persiste avec une demi-vie d'environ trente jours dans les tissus pulmonaires des singes traités; (2) l'efficacité du transfert génétique est corrélée à la dose virale totale administrée; (3) les gènes transférés sont correctement exprimés: les ARN *CFTR* et *βgal* peuvent être détectés par RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*)

jusqu'à cent jours après l'instillation virale, et la protéine β Gal est mise en évidence par coloration enzymatique dans la majorité des cellules des voies aériennes, y compris dans les glandes sous-muqueuses (figure 2); (4) le vecteur viral recombinant reste confiné dans les tissus cibles (la trachée et les bronches) et ne dissémine que rarement (œsophage et rate), voire pas du tout (cellules sexuelles) dans d'autres organes [34]; (5) le virus recombinant est faiblement excrété dans les fèces des animaux traités pendant deux à quatre jours après l'administration virale, mais uniquement pour les singes traités par de fortes doses de vecteurs (10^{10} - 10^{11} ufp); (6) l'administration du vecteur adénoviral par instillation ou nébulisation ne s'accompagne pas de déviation significative des paramètres hématologiques ou biochimiques, aucune modification notable du comportement des animaux n'a été relevée, et aucun changement pathologique significatif n'a été mis en évidence.

Une infiltration lymphocytaire péri-bronchique et périvasculaire modérée ainsi qu'une pneumonie interstitielle ont néanmoins été observées dans les poumons de nos singes ayant

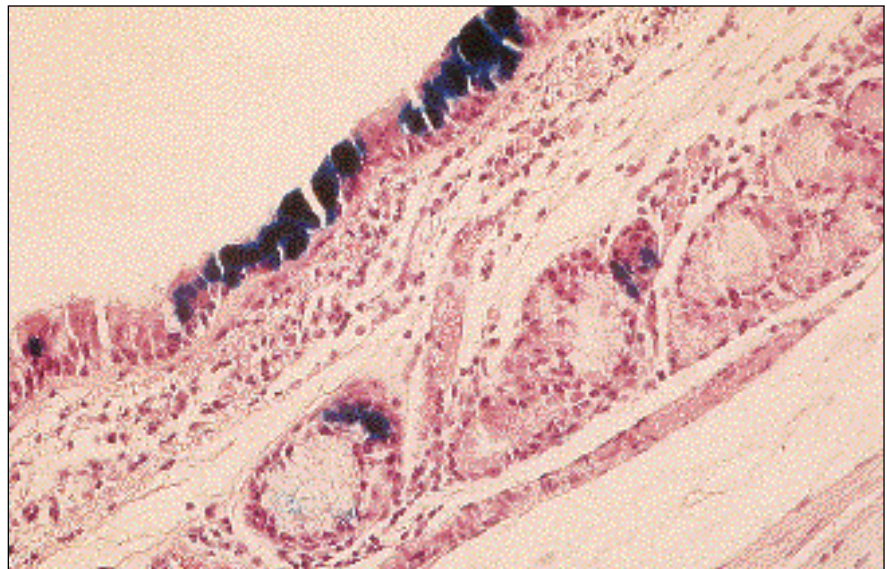


Figure 2. Analyse microscopique du tractus trachéobronchique d'un singe traité par administration du vecteur Ad β gal. L'expression du gène marqueur lacZ est mise en évidence dans les cellules épithéliales et dans les cellules de la glande sous-muqueuse par une coloration nucléaire bleue.

RÉFÉRENCES

30. Alton EFWF, Middleton PG, Caplen NJ, Smith SN, Steel DM, Munkonge FM, Jeffery PK, Geddes DM, Hart SL, Williamson R, Faldut KI, Miller AD, Dickinson P, Stevenson BJ, McLachlan G, Dorin JR, Porteous DJ. Non-invasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice. *Nature Genet* 1993; 5: 135-42.
31. Caplen NJ, Alton EFWF, Middleton PG, Dorin JR, Stevenson BJ, Gao X, Durham SR, Jeffery PK, Hodson ME, Coutelle C, Huang L, Porteous DJ, Williamson R, Geddes DM. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nature Med* 1995; 1: 39-46.
32. Grubb BR, Pickles R, Ye H, Yankaskas JR, Vick RN, Engelhardt JF, Wilson JM, Johnson LG, Boucher RC. Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. *Nature* 1994; 371: 802-6.
33. Dupuit F, Bout A, Hinrasky J, Fuchey C, Zahm JM, Imler JL, Pavirani A, Valerio D, Puchelle E. Expression and localization of CFTR in the rhesus monkey surface airway epithelium. *Gene Ther* 1995; 2: 156-63.
34. Imler JL, Bout A, Perricaudet M, Baskin G, Scholte B, Pavirani A, Valerio D. Lung specific gene therapy. In: Escobar H, Baquero F, Suarez L, eds. *Clinical ecology of cystic fibrosis*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993: 21-5.
35. Engelhardt JF, Simon RH, Yang Y, Zepeda M, Weber-Pendleton S, Doranz B, Grossman M, Wilson JM. Adenovirus mediated transfer of the CFTR gene to lung of non-human primates: biological efficacy study. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 759-69.
36. Simon RH, Engelhardt JF, Yang Y, Zepeda M, Weber-Pendleton S, Grossman M, Wilson JM. Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of non human primates: toxicity study. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 771-80.
37. Bout A, Perricaudet M, Baskin G, Imler JL, Scholte BJ, Pavirani A, Valerio D. Lung gene therapy: *in vivo* adenovirus mediated gene transfer to rhesus monkey airway epithelium. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 3-10.
38. Bout A, Imler JL, Schultz H, Perricaudet M, Zurcher C, Herbrink P, Valerio D, Pavirani A. *In vivo* adenovirus-mediated transfer of human CFTR cDNA to rhesus monkey airway epithelium: efficacy, toxicity and safety. *Gene Ther* 1994; 1: 385-94.
39. Zabner J, Petersen DM, Puga AP, Graham SM, Couture LA, Keyes LD, Lukason MJ, St George JA, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Safety and efficacy of repetitive adenovirus-mediated transfer of CFTR cDNA to airway epithelia of primates and cotton rats. *Nature Genet* 1994; 6: 75-83.

reçu des doses virales comprises entre $7,5 \times 10^9$ et $1,7 \times 10^{11}$ upf. Aucune altération semblable n'a en revanche été observée dans les poumons des animaux ayant été traités par des doses virales plus faibles ($1,5 \times 10^7 - 5 \times 10^9$ upf). Il est à noter qu'une double administration virale ne s'accompagne pas dans notre étude d'anomalies supplémentaires, et que tous les autres organes de tous les animaux inclus dans cette étude restent parfaitement indemnes de toute altération. Ces observations sont semblables à celles décrites par les équipes américaines ayant réalisé des études comparables [35, 36, 39, 40]: ainsi, les groupes de J. Wilson [35, 36], M.J. Welsh [39] et R. Crystal [40] observent également une transduction efficace des cellules épithéliales pulmonaires des singes traités par instillation du vecteur, sans toxicité notable à l'exception d'une réponse inflammatoire locale limitée associée à l'administration des fortes doses virales. Cependant, il a été rapporté par le groupe de J. Wilson qu'un des babouins traités a développé une inflammation alvéolaire sévère en réaction à l'instillation de fortes doses virales [36]. Cette observation, ainsi que l'induction de réactions inflammatoires plus limitées dans les autres études, mettent en évidence ce qui constitue probablement l'inconvénient majeur des vecteurs adénoviraux de première génération, à savoir leur immunogénicité.

Réponses immunitaires anti-adénovirus

Les particules adénovirales, en effet, sont immunogènes et l'administration dans les voies pulmonaires du vecteur AdCFTR induit une réponse immunologique tant humorale que cellulaire pouvant constituer un obstacle important à toute future application clinique. La synthèse d'anticorps anti-adénovirus circulants a été observée chez plusieurs de nos singes, avec un titre maximal détecté entre 14 et 26 jours après l'inoculation du vecteur [38]. Cette réponse humorale n'apparaît pas inhiber l'efficacité de réadministration du vecteur et de transduction des cellules cibles, et une expression du gène passager est aisément mise en évidence lors d'une seconde inocula-

tion du virus [38, 39, 42]. Le niveau absolu d'expression du gène transféré reste néanmoins inversement proportionnel au niveau d'anticorps neutralisants circulants, suggérant une transduction moins efficace des cellules cibles du fait de la neutralisation d'une partie des particules virales recombinantes [39, 42]. L'impact de la réponse immunitaire cellulaire, ainsi que de l'inflammation à fortes doses virales, est beaucoup plus préjudiciable. Les vecteurs adénoviraux de première génération, bien que délétés des gènes *E1* essentiels à la réplication virale et à l'expression des protéines tardives, sont en effet encore capables d'exprimer faiblement certaines protéines virales de structure [43, 44]. Les cellules infectées sont en conséquence reconnues comme étrangères par le système immunitaire de l'hôte traité et sont rapidement éliminées. C'est pourquoi l'expression *in vivo* d'un gène étranger transféré par des vecteurs adénoviraux est toujours transitoire, et seule l'administration des vecteurs à des hôtes immunodéprimés (exemple: souris *nude*, souris *scid*, souris *RAG-2 -/-*, animaux nouveau-nés ou traités par des immunosuppresseurs...) permet une expression stable et permanente du gène transféré ([43-46], nos données non publiées). En conséquence, à moins d'induire une immunosuppression des patients à traiter, les vecteurs adénoviraux actuels ne sont pas des outils bien adaptés à une thérapie génique des maladies génétiques pour lesquelles une expression continue des gènes transférés est indispensable. A l'opposé, leur utilisation pour le traitement de maladies acquises, et tout particulièrement des cancers où l'expression des gènes thérapeutiques doit souvent être transitoire, est bien plus prometteuse [47].

Le développement de nouveaux vecteurs adénoviraux moins immunogènes est donc une condition indispensable à un transfert efficace et stable du gène *CFTR*.

Études cliniques

Les études précliniques ayant démontré l'innocuité du transfert adénoviral du gène *CFTR*, et permis la mise en évidence d'une transduc-

RÉFÉRENCES

40. Brody SL, Metzger M, Danel C, Rosenfeld MA, Crystal RG. Acute responses of non-human primates to airway delivery of an adenovirus vector containing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 821-36.
41. Sene C, Bout A, Imler JL, Schultz H, Willemot JM, Hennebel V, Zurcher C, Valerio D, Lamy D, Pavirani A. Aerosol-mediated delivery of recombinant adenovirus to the airways of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 1595-601.
42. Yei S, Mittereder N, Tang K, O'Sullivan C, Trapnell BC. Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: quantitative evaluation of repeated *in vivo* vector administration to the lung. *Gene Ther* 1994; 1: 192-200.
43. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gönczöl E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenovirus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4407-11.
44. Yang Y, Ertl HCJ, Wilson JM. MHC Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1994; 1: 433-42.
45. Stratford-Perricaudet LD, Levrero M, Chasse JF, Perricaudet M, Briand P. Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum Gene Ther* 1990; 1: 241-56.
46. Zsengeller ZK, Wert SE, Hull WM, Hu X, Yei S, Trapnell BC, Whitsett JA. Persistence of replication-deficient adenovirus-mediated gene transfer in lungs of immune-deficient (nu/nu) mice. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 457-67.
47. Haddada H, Ragot T, Cordier L, Dufour MT, Perricaudet M. Adenoviral interleukin-2 gene transfer into P815 tumor cells abrogates tumorigenicity and induces antitumoral immunity in mice. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 703-11.
48. Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 1993; 75: 207-16.
49. Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA, Chu CS, Mastrangeli A, Hay JG, Brody SL, Jaffe HA, Eissa NT, Danel C. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nature Genet* 1994; 8: 42-51.
50. Wilson JM. Gene therapy of cystic fibrosis lung disease using E1 deleted adenoviruses: a phase I trial. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 501-19.
- tion génétique efficace mais néanmoins transitoire, plusieurs essais cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose ont d'ores et déjà été entrepris en États-Unis et en France, incluant plus d'une cinquantaine de patients [48-55]. Le but de ces premiers essais est l'évaluation de la faisabilité, de la toxicité et de l'efficacité du transfert et de l'expression du gène *CFTR* normal dans l'épithélium nasal ou pulmonaire. Certains de ces essais visent également à évaluer des modes d'administration plus compatibles avec un traitement (exemple: aérosolisation du vecteur adénoviral dans l'étude clinique menée par Transgène et G. Bellon à l'hôpital Lyon-Sud), ou la réponse à une administration répétée du vecteur recombinant.
- Les premiers résultats publiés, utilisant un vecteur adénoviral de type 2 non délété des séquences *E3* [14], sont ceux de l'équipe de M. Welsh (*H. Hugues Medical Institute, IO, USA*), montrant qu'une administration unique du vecteur adénoviral sur l'épithélium nasal de trois patients corrige le défaut héréditaire de transport du chlore. Cette correction persiste cependant moins de trois semaines, suggérant la nécessité d'une administration répétée du vecteur thérapeutique [48]. R. Crystal a inclus dans son essai clinique neuf patients (six hommes et trois femmes), qui ont reçu au niveau nasal entre 2.10^5 et 2.10^8 ufp, et au niveau bronchique entre 2.10^6 et 2.10^9 ufp du vecteur AdCFTR dérivé de l'Ad5 délété de *E3* [15], administré par instillation bronchoscopique [49]. Les résultats de cette étude indiquent que l'ADNc *CFTR* transféré s'exprime correctement dans les cellules épithéliales respiratoires, expression mise en évidence par détection d'ARN messager et/ou de la protéine CFTR pendant une dizaine de jours après l'administration unique nasale ou bronchique d'AdCFTR.
- De manière semblable à l'étude de M. Welsh, l'essai entrepris par R. Boucher et M. Knowles (*Chapel Hill, NC, USA*) a consisté en l'administration nasale du vecteur adénoviral [51]: une expression d'ARN messager *CFTR* a été mise en évidence chez cinq patients sur huit mais aucune amélioration électrophysiologique n'a été détectée au niveau de l'épithélium nasal. De son côté, J. Wilson (*Institute for Human Gene Therapy, Philadelphia, PA, USA*) a procédé à l'administration bronchique du vecteur adénoviral par bronchofibroscopie, et décrit chez certains patients une expression du gène *CFTR* mise en évidence par RT-PCR ou histochimie *in situ* au niveau de la muqueuse bronchique.
- Conformément aux études précliniques chez le singe, aucun trouble significatif n'a été observé chez les patients traités par une dose virale faible ou modérée. Ainsi, R. Crystal n'a rapporté ni élévation d'anticorps neutralisants, ni recombinaison/complémentation ou excrétion du vecteur jusqu'à la dose de 2.10^9 ufp [49]. Cependant, une réaction transitoire systémique et pulmonaire, probablement liée à l'interleukine 6 [49, 56], est apparue chez un patient à la plus forte dose (2.10^9 ufp) après administration bronchoscopique intralobaire. Cette réaction a comporté céphalées, fatigue, fièvre, tachycardie, hypotension, dyspnée avec perturbation de la fonction respiratoire et infiltrats pulmonaires à la radiographie; ces signes se sont amendés en un mois. L'hypothèse la plus probable pour cet événement serait une inflammation du tractus respiratoire induite par le vecteur; cependant, l'important volume d'administration (20 ml) peut également avoir favorisé ce syndrome pulmonaire. Au niveau de l'épithélium nasal, jusqu'à la dose de 6.10^9 ufp, les résultats des tests de toxicité clinique et biologique indiquent pour les différentes études une bonne tolérance et aucun effet indésirable lié aux vecteurs adénoviraux. En revanche, l'équipe de M. Knowles a rapporté, à la dose de 2.10^{10} ufp, une réaction inflammatoire comprenant une congestion accompagnée de sécrétions et une sensibilité de la muqueuse de l'épithélium nasal pendant six jours chez deux patients sur les trois traités à cette dose [51].
- Le premier essai clinique de thérapie génique de la mucoviscidose utilisant un vecteur adénoviral *CFTR* administré par aérosol sur l'ensemble du tractus respiratoire a été réalisé par G. Bellon à Lyon, en collaboration avec Transgène (Strasbourg). La tolérance clinique et biologique des patients

RÉFÉRENCES

51. Knowles MR, Hohneker K, Zhou Z, Olsen JC, Noah TL, Hu PC, Leigh MW, Engelhardt JF, Edwards LJ, Jones KR, Grossman M, Wilson JM, Johnson LG, Boucher RC. A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1995; 333: 821-31.
52. Wilmott RW, Whitsett JA. Gene therapy for cystic fibrosis utilizing a replication deficient recombinant adenovirus vector to deliver the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the airways. A phase I study. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 1019-57.
53. Dorkin H, Lapey A. Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: safety of single administration in the lung. *Fed Regist* 1994; 59: 55796.
54. Welsh M. Adenovirus-mediated gene transfer of *CFTR* to the nasal epithelium and maxillary sinus of patients with cystic fibrosis. *Fed Regist* 1993; 58: 59612.
55. Crystal R. Evaluation of repeat administration of a replication deficient recombinant adenovirus containing the normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cDNA to the airways of individuals with cystic fibrosis. *Fed Regist* 1994; 59: 43426.
56. McElvaney NG, Crystal RG. IL-6 release and airway administration of human *CFTR* cDNA adenovirus vector. *Nature Med* 1995; 1: 182-4.
57. Mitani K, Graham FL, Caskey CT, Kochanek S. Rescue, propagation and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3854-8.
58. Engelhardt JF, Ye X, Doranz B, Wilson JM. Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6196-200.
59. Goldman MJ, Litzky LA, Engelhardt JF, Wilson JM. Transfer of the *CFTR* gene to the lung of non-human primates with E1-deleted, E2A-defective recombinant adenoviruses: a preclinical toxicology study. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 839-51.
60. Lee MG, Abina MA, Haddada H, Perricaudet M. The constitutive expression of the immunomodulatory gp19K protein in *E1-, E3-* adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against the vector. *Gene Ther* 1995; 2: 256-62.

traités par instillation nasale et par aérosol respectivement jusqu'à 4.10^8 et $5.4.10^8$ upf a été bonne, l'expression du gène *CFTR* transféré ayant été mise en évidence par RT-PCR et immunohistochimie jusqu'à deux à trois semaines après l'administration du vecteur (données non publiées). Bien que le développement clinique d'une telle thérapie génique somatique par transfert adénoviral du gène *CFTR* n'en soit qu'à ses débuts, les données actuelles confirment les résultats précliniques et démontrent une tolérance satisfaisante au vecteur et une transduction efficace de l'épithélium. La correction du défaut génétique, en particulier au niveau pulmonaire, est donc théoriquement possible, à la condition de pouvoir maintenir une expression suffisamment stable du gène transféré. En outre, ce type de traitement devra être entrepris à un stade précoce de la maladie avant l'apparition d'atteintes irréversibles.

Conclusions et perspectives

Les nombreuses études précliniques et cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose réalisées récemment aux États-Unis et en France confirment l'intérêt potentiel de l'adénovirus pour transférer le gène *CFTR* humain dans l'épithélium pulmonaire. Le vecteur adénoviral permet, en effet, une transduction très efficace du gène thérapeutique qui est correctement exprimé dans les cellules ainsi modifiées. Par ailleurs, des quantités importantes d'adénovirus recombinants peuvent être produites, contrairement à d'autres vecteurs viraux (exemple: rétrovirus, AAV) dont la production à grande échelle est bien plus difficile. Cependant, ces études précliniques ont également mis en évidence chez les animaux traités l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire dirigée contre les cellules infectées. Les conséquences de cette réaction immunitaire sont importantes car les cellules infectées sont progressivement éliminées, et l'expression du gène thérapeutique ne peut être que transitoire. Cette réaction immunitaire est essentiellement dirigée contre des protéines adénovirales de structure néo-synthétisées dans les cellules infectées [43, 44]. En effet, bien que *E1* soit délété,

et que le vecteur soit non réplicatif, les gènes codant pour certaines protéines structurales sont encore fonctionnels. Les vecteurs adénoviraux actuels ne peuvent donc être sérieusement considérés pour un traitement définitif de la mucoviscidose, et il est essentiel de tenter de développer une nouvelle génération de vecteurs dont l'efficacité de transduction soit conservée, mais avec lesquels l'expression des protéines virales serait complètement abolie. Un adénovirus « minimal » qui, à l'image des vecteurs rétroviraux, ne contiendrait que le gène thérapeutique et serait délété de tous les gènes viraux, serait un vecteur idéal. Mais la construction d'un tel vecteur impose de disposer d'une lignée de complémentation capable de fournir en *trans* toutes les protéines virales indispensables à la production du virus recombinant. Cela a été tenté par plusieurs équipes, dont la nôtre, mais sans succès en raison de la toxicité importante de nombreuses protéines virales. Alternativement, l'utilisation d'un virus auxiliaire conditionnel supportant la croissance du vecteur « minimal » mais pouvant être éliminé en fin de production constitue une approche théoriquement réalisable. Cette voie est actuellement activement évaluée par de nombreuses équipes, mais se heurte toujours à l'impossibilité de se débarrasser totalement du virus auxiliaire [57]. C'est pourquoi une stratégie intermédiaire, consistant à déléter ou inactiver, outre *E1*, un ou plusieurs gènes supplémentaires codant pour des protéines régulatrices, a été préférée par plusieurs équipes. La délétion de ces gènes, essentiellement les gènes *E2A* et/ou *E4* (figure 1), permettrait de fortement réduire, voire d'abolir complètement l'expression des gènes viraux tardifs. Ainsi, très récemment, le groupe de J. Wilson a démontré que l'administration à des souris [58] ou des babouins [59] d'un vecteur délété de *E1*, et dont le gène *E2A* est inactivé par une mutation thermosensible, permet une expression plus prolongée du gène étranger (*β gal*, *CFTR*), et s'accompagne d'une réduction notable de l'inflammation périvasculaire. Bien que la mutation thermosensible utilisée par ce groupe soit peu stable (car n'affectant qu'un seul acide aminé de *E2A*), ces observations confirment l'intérêt potentiel de

ces nouveaux vecteurs. Aujourd'hui, d'autres vecteurs potentiellement intéressants sont disponibles dans plusieurs laboratoires, dont le nôtre : ce sont des vecteurs délétés simultanément des régions *E1* et *E4* ou des régions *E1* et *E2A*. Pour tous ces virus, de nouvelles lignées cellulaires de complémentation ont dû être mises au point afin d'assurer leur production. Ces vecteurs sont actuellement en cours d'évaluation *in vitro* et *in vivo*. Une approche alternative également envisagée par certaines équipes consiste, non pas à déléter les gènes viraux de régulation, mais à tirer avantage de mécanismes développés naturellement par le virus pour contrer la réponse immunitaire de l'hôte infecté. Ainsi, la région virale *E3* code pour de nombreuses protéines modulant la réponse immunitaire [13], mais cette région immunomodulatrice est, soit délétée dans la majorité des vecteurs, soit, plus rarement, conservée mais non exprimée car son activateur *E1* est absent. La construction de vecteurs assurant une expression constitutive de toute cette région *E3* (nos données non publiées) ou uniquement d'un gène important de cette région [59] est possible et peut éventuellement permettre d'atténuer le pouvoir immunogénique des vecteurs adénoviraux. Les résultats issus des nombreuses évaluations en cours de ces différents nouveaux vecteurs devraient permettre de mieux appréhender la faisabilité d'un traitement de la mucoviscidose par transfert adénoviral du gène *CFTR* ■

Remerciements

Nous remercions les Drs J.L. Imler, C. Sené et nos collaborateurs du département de Thérapie génique de Transgène, ainsi que les Drs D. Valerio, A. Bout et C. Zurcher (IntroGene, TNO Rijswijk, Université de Leiden) pour les expérimentations animales et l'analyse anatomopathologique. Nous remercions également les Drs J.M. Willemot et V. Hennebel (Air Liquide, Paris) pour leur assistance dans le développement de la procédure d'aérosolisation des vecteurs adénoviraux et N. Monfrini pour l'excellente assistance éditoriale. Ce travail a été soutenu en partie par l'Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose (AFLM).

Summary

Gene therapy for cystic fibrosis using adenovirus vectors

Mutations in the *CFTR* gene are responsible for the clinical manifestations of cystic fibrosis (CF). Since approximately 95% of the morbidity and mortality related to the disease arise from pulmonary complications, the primary target for gene therapy of CF is the respiratory epithelium, in which reversal of the CF phenotype can be envisaged. In the past few years, CF has thus emerged as an early experimental model for human gene therapies utilizing the first generation (E1-deleted) recombinant adenoviruses. The efforts undertaken to implement a safe and efficient transfer of the *CFTR* gene to the airways of animals and CF patients are also stimulating a more precise understanding of the immunology of the virus in the respiratory environment. Several groups have undertaken large studies in the airways of mice, cotton rats, Rhesus monkeys and baboons to assess efficiency of gene transfer as well as safety parameters. Such preclinical studies have shown that biological efficacy of gene delivery could be achieved for few weeks without signs of severe toxicity depending of the virus dose which was administered. These results have encouraged the design of several clinical trials involving CF patients which at present are underway. The large body of data collected during these last years has highlighted the limitations of the first generation of adenovirus vectors (mainly the immunoresponses elicited by the host), but also stimulated improvements in vector engineering and in knowledge of adenovirus biology. Both approaches will provide more rational strategies to treat cystic fibrosis by genetic means.

TIRÉS À PART

A. Pavirani.



Vient de paraître

Le nouveau Rosenwald 1996

La 108^e édition 1996 du **GUIDE ROSENWALD** vient de paraître en 3 volumes de 5 474 pages. C'est un véritable record ! Plus de la moitié des fiches des 153 084 médecins et 11 382 établissements recensés sont corrigées par les médecins et établissements eux-mêmes d'une édition sur l'autre. Ces informations fiables, utiles et indispensables, en permanence à portée de votre main, faciles à trouver, vous font gagner un temps précieux.

Cette année encore, le **Rosenwald 1996** contient de nombreuses améliorations de contenu et de forme pour mieux satisfaire les besoins du corps médical français. Ce qui justifie la politique du Guide : satisfait ou remboursé.

- Le tome 1 (2 050 pages) fournit tous les renseignements sur les 153 084 médecins hospitaliers et libéraux, classés par ordre alphabétique pour la France entière.
- Le tome 2 (2 030 pages), reclasse les médecins par ordre géographique et par spécialités.
- Le tome 3 (1 380 pages) regroupe les généralistes classés par département et les partenaires de la Santé : administrations, laboratoires et fournisseurs, hôpitaux et cliniques.

Cet ouvrage complet vous aide dans votre travail quotidien. Il est irremplaçable pour constituer un carnet d'adresses, vérifier un téléphone ou un fax, rechercher un confrère ou un établissement.

Depuis des générations, les médecins utilisent le **Rosenwald**. Ils sont sûrs d'y retrouver rapidement tout ce qu'il faut savoir sur les médecins, les établissements de soins et les professionnels de la Santé.

Chaque fiche biographique du médecin ou signalétique de l'établissement est la plus complète possible. Plusieurs classements : alphabétique, géographique, par spécialités et disciplines permettent de trouver immédiatement les renseignements précis recherchés.

Guide Rosenwald, 10, rue Vimeuse,
75784 Paris Cedex 16
Tél. : 44.30.81.00 - Fax : 44.30.81.11

1 volume : 465 F, 2 volumes : 830 F,
3 volumes : 1 180 F