

> L'apparition du concept de gène médicament a considérablement élargi le champ d'application de la thérapie génique. Initialement développées pour les maladies génétiques ou certaines formes de cancer, les stratégies de transfert génique sont désormais étudiées en vue du traitement d'autres pathologies telles que les maladies ostéo-articulaires. La polyarthrite rhumatoïde a ainsi fait l'objet du premier essai clinique de thérapie génique pour le traitement d'une maladie non létale. <

## Application des techniques de thérapie génique aux maladies ostéo-articulaires

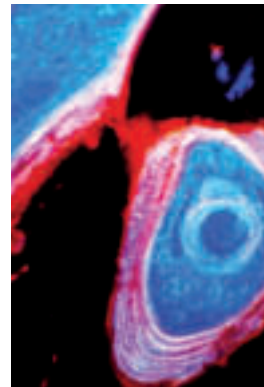
Jean-Noël Guoze, Christopher H. Evans, Steven C. Ghivizzani, Elvire Guoze

Le développement de traitements par thérapie génique constitue une avancée médicale extraordinaire et suscite beaucoup d'espoir. Deux premiers succès cliniques ont été obtenus en France, puis en Grande-Bretagne, avec la guérison d'enfants atteints d'un déficit immunitaire sévère [1, 2]. Après l'apparition de 3 cas de leucémie dans l'essai français [3], de nombreux progrès ont été faits dans la compréhension des mécanismes responsables de l'apparition d'effets indésirables. Cette connaissance est d'autant plus indispensable lorsque les techniques de transfert génique s'appliquent au traitement de pathologies non létales telles que la plupart des maladies ostéo-articulaires.

### Pourquoi avoir développé de nouvelles thérapies pour les maladies ostéo-articulaires ?

Un tiers des populations occidentales serait atteint par les pathologies articulaires inflammatoires et/ou dégénératives, dont les plus fréquentes sont la polyarthrite rhumatoïde (PR) et l'arthrose. Ce type de maladie constitue la première cause d'invalidité chez les personnes âgées de plus de 65 ans. Grâce aux traitements actuels plus puissants et mieux ciblés, le recours à la chirurgie est moins nécessaire et un nombre croissant de patients conserve une activité professionnelle.

L'association entre traitements symptomatiques et traitements de fond reste cependant lourde, et s'ac-



compagne bien souvent d'effets secondaires (Tableau I). Lors d'épisodes aigus, il est nécessaire de calmer la douleur et de juguler l'inflammation. Les prescriptions de corticoïdes et d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) traditionnels sont efficaces lors des périodes inflammatoires sévères, mais ne peuvent pas être prescrits à long terme. Les inhibiteurs spécifiques de la cyclo-oxygénase-2 («coxibs») permettent des thérapies plus longues en diminuant les effets indésirables gastro-intestinaux observés avec les AINS traditionnels. Cependant, en février 2005, l'AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) a publié une nouvelle liste de contre-indications les concernant : cette information fait suite au retrait du marché du rofécoxib (Vioxx®), intervenant après l'apparition de complications sévères vasculaires, cardiaques ou cérébrales. Dans les pathologies les plus avancées, les traitements de fond tels que les médicaments modifiant l'affection rhumatismale (DMARD, *disease modifying anti-rheumatic drugs*) et les protéines modificatrices de la réponse biologique (BRM, *biologic response modifier*) restent essentiels. Les DMARD affaiblissent cependant la réponse du sys-

J.N Guoze,  
S.C. Ghivizzani, E. Guoze :  
Department of orthopaedics  
and rehabilitation, Gene therapy  
laboratory, University of Florida,  
1600 SW Archer Rd, Rm M2-210,  
Gainesville, FL 32610, États-Unis.  
C.H. Evans : Center  
for molecular orthopaedics,  
Harvard Medical School,  
221, Longwood Avenue, BLI-152,  
Boston, MA 02115, États-Unis.  
[gouzej@ortho.ufl.edu](mailto:gouzej@ortho.ufl.edu)

Article reçu le 6 février 2006, accepté le 15 juillet 2006.

tème immunitaire face à une agression extérieure. Quant aux BRM, et notamment aux anti-TNF (*tumor necrosis factor*), ils ont révolutionné les traitements actuels. Cependant, pour être efficaces, ces traitements nécessitent des injections répétées et fréquentes. L'aspect financier non négligeable, que l'administration s'effectue en ambulatoire ou à l'hôpital, handicape encore leur généralisation : de fait, ce traitement concerne moins d'un quart des patients atteints de PR sévères en France. L'estimation du coût total de ces biothérapies (coûts médicaux directs, coûts non médicaux directs et coûts indirects) oscille en effet entre 15 000 et 20 000 euros par an et par patient, parfois plus.

La thérapie génique, en permettant une production constante de la protéine médicament directement dans l'articulation, limiterait de façon considérable le nombre d'injections nécessaires ainsi que le coût global du traitement. De plus, l'activité biologique des protéines transgéniques semble supérieure à celle des protéines recombinantes [4, 5]. *In vivo*, lors de l'utilisation de l'antagoniste du récepteur de l'interleukine-1 (IL-1) (IL-1R $\alpha$ ) dans un modèle d'arthrite chez le rat, cette différence atteint même un ordre de magnitude 4 [6].

### Quels gènes sont les meilleurs candidats ? Pour quels apports thérapeutiques ?

#### Dans la polyarthrite rhumatoïde

Dans une articulation atteinte de PR, la présence chronique de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 ou le TNF $\alpha$  active les cellules de la membrane synoviale hypertrophiée, induisant la sécrétion de différentes protéines qui érodent l'os et le cartilage environnants. L'élimination des cellules participant au développement de la maladie par surexpression

de protéines apoptotiques, notamment, constitue une stratégie thérapeutique intéressante. Ainsi, le transfert intra-articulaire du gène de la thymidine kinase, dont le produit phosphoryle le ganciclovir administré par voie veineuse en un inhibiteur de l'ADN polymérase, induit une cytolyse de la membrane synoviale et une diminution du volume de l'articulation dans un modèle d'arthrite induite par antigène chez le lapin [7], ou par le collagène chez le singe [8]. Un autre exemple de synovectomie génétique a été réalisé en utilisant le transfert de Fas ligand (FasL) dans un modèle d'arthrite au collagène chez la souris [9, 10].

Face à la chronicité des processus impliqués dans la PR, une stratégie bloquant les phases de poussées inflammatoires constitue une autre approche thérapeutique. Chez le rat, l'administration intra-articulaire ou systémique d'un *adeno-associated virus* de type 2 (AAV-2) exprimant le récepteur du TNF $\alpha$  (p75, TNFR) couplé à une immunoglobuline (TNFR:Fc) (Ethanercept) dans un modèle d'arthrite induite par le streptocoque se traduit par une très forte diminution de l'infiltration cellulaire, de la formation du pannus, de la dégradation des tissus cartilagineux et osseux et de l'expression des ARN messagers de différentes cytokines pro-inflammatoires [11]. Des résultats similaires ont été obtenus après administration intra-articulaire de la forme soluble du TNFR à des souris transgéniques arthritiques exprimant le TNF $\alpha$  [12]. L'injection intra-articulaire de l'ADNc codant pour l'IL-1R $\alpha$  (Anakinra) via un AAV ou un lentivirus chez le rat réduit l'inflammation de la membrane synoviale et les effets cataboliques sur le cartilage dans des modèles d'arthrites induites respectivement par le LPS [13] ou l'IL-1 [14]. De nombreux autres transgènes (Tableau II) et leurs potentiels anti-arthritiques ont également été testés. Citons notamment ceux codant pour les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10, dont la surexpression prévient la dégradation du cartilage et l'inflammation dans des modèles d'arthrites induites par le collagène chez la souris [15, 16].

un lentivirus chez le rat réduit l'inflammation de la membrane synoviale et les effets cataboliques sur le cartilage dans des modèles d'arthrites induites respectivement par le LPS [13] ou l'IL-1 [14]. De nombreux autres transgènes (Tableau II) et leurs potentiels anti-arthritiques ont également été testés. Citons notamment ceux codant pour les cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10, dont la surexpression prévient la dégradation du cartilage et l'inflammation dans des modèles d'arthrites induites par le collagène chez la souris [15, 16].

#### Dans l'arthrose

La dégradation du cartilage dans l'arthrose se traduit par une perte des composants matriciels, en particulier des protéoglycanes, associée à un changement qualitatif des fibres de collagène. Des différents médiateurs responsables de la perte des

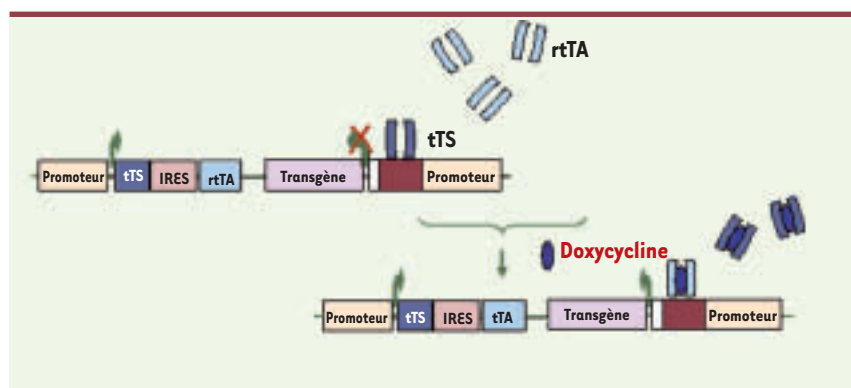
	Exemples	Commentaires
<b>Analgésiques</b>	Paracétamol, sulfate de morphine	Palliatifs
<b>AINS</b>	Traditionnels : diclofénac, ibuprofène, kétoprofène	Palliatifs, troubles gastro-intestinaux
	Inhibiteurs de COX2 : coxibs	Rofécocixib : retiré du marché (Vioxx®) Célécoxib : palliatif + nombreuses contre-indications
	Salicylate : aspirine	Palliatif
<b>Corticostéroïdes</b>	Cortisone sulfate, dexaméthasone	Palliatifs, traitements de courte durée
<b>DMARD</b>	Léflunomide, méthotrexate, sulfasalazine	Palliatifs, suppresseur du système immunitaire
<b>BRM</b>	TNF bloquant : adalimumab, ethanercept, infliximab	Injections répétées, coût élevé, contre-indications*
	IL-1 bloquant : anakinra	Injections répétées, coût élevé

**Tableau I. Traitements actuels disponibles pour les maladies ostéo-articulaires.** \* Adalimumab, ethanercept et infliximab présentent tous trois des contre-indications (c'est-à-dire tuberculose évolutive, septicémie ou risque de septicémie, insuffisance cardiaque...).

composants matriciels du cartilage, l'IL-1 est de loin le plus important. À faible concentration, l'IL-1 inhibe fortement la synthèse de cartilage, tandis que des concentrations élevées entraînent sa dégradation [17]. La surexpression de gène(s) inhibant les voies signalétiques de l'IL-1 est, de même que pour la PR, attrayante dans le traitement de l'arthrose. L'IL-1R $\alpha$  seul ou en combinaison avec l'IGF1 (*insulin-like growth factor*) a donné des résultats intéressants, en bloquant la déplétion en protéoglycanes sur des explants cartilagineux stimulés par l'IL-1 [18]. L'administration de synoviocytes surexprimant l'IL-1R $\alpha$  dans des modèles d'arthrose par section du ligament croisé antérieur chez le chien s'est traduite par une réduction nette des lésions macroscopiques cartilagineuses au niveau du plateau tibial et des condyles [19]. Des résultats similaires ont été obtenus après injection intra-articulaire directe d'un adénovirus exprimant l'IL-1R $\alpha$  dans un modèle d'arthrose équine [20]. De manière intéressante, dans un modèle de section du ligament croisé antérieur chez le lapin, l'association avec l'IL-10 augmente le potentiel thérapeutique de l'IL-1R $\alpha$  [21].

L'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (CSM) et de leur potentiel à former des tissus cartilagineux dans différents supports matriciels semble une stratégie prometteuse dans l'optique d'une réparation tissulaire [22, 23]. Différents gènes codant pour des facteurs de croissances (IGF1, BMP [*bone morphogenic protein*] 2, 4, 6 et 7, TGF $\beta$ ), des facteurs de transcription (sox-5,-6,-9) ou d'autres molécules (SMAD, Indian Hedgehog, protéines wnt) influencent l'homéostasie du cartilage en favorisant l'anabolisme [24-27]. Des CSM de lapin transduites par un adénovirus transportant l'ADNc codant pour BMP2 ont développé un phénotype chondrocytaire après 3 semaines de culture (matrice extracellulaire riche en collagène de type II et agrécane, absence de collagène de type I) [28]. Ces protéines transgéniques peuvent également être utilisées en combinaison avec des molécules réduisant le catabolisme de la matrice cartilagineuse (inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles, notamment). Toutefois, la diffusion systémique de certaines de ces protéines entraîne parfois des effets secondaires plus ou moins graves. Ainsi, la surexpression du TGF $\beta$  dans la membrane synoviale provoque l'apparition de fibroses pulmonaires massives nécessitant l'euthanasie de l'animal (données personnelles), tandis que le transfert de l'ADNc exprimant BMP2 a été suivi de formations osseuses ectopiques [29].

Une autre approche utilisant l'accumulation intracellulaire de glucosamine semble protéger les cellules contre les effets néfastes de l'IL-1 [30]. La glucosamine est utilisée de façon empirique dans le traitement de l'arthrose, et bien que ce ne soit pas une protéine, son accumulation est rendue possible par la surexpression de la glutamine fructose 6-phosphate-amido-transférase (GFAT), enzyme impliquée dans sa biosynthèse. *In vitro*, une inhibition des effets néfastes de l'IL-1 a été observée à la fois sur des synoviocytes et des chondrocytes préalablement transduits par un adénovirus codant pour l'ADNc de la GFAT [31]. *In vivo*, l'administration intra-articulaire de cet adénovirus prévient la dégradation du cartilage dans un modèle d'arthrite chez le rat (données personnelles).



**Figure 1.** Le système inducible par la doxycycline (DOX) [TET-ON (rtTA/tTS)]. En l'absence de DOX, le ligand DOX-dependent trans-silencer (tTS) se fixe sur le promoteur et réprime l'expression du transgène. En présence de DOX, tTS se détache de l'ADN et le transactivateur inversement régulé par le ligand (rtTA) s'y fixe et permet l'expression du transgène.

Protéines utiles	Effet(s) potentiels sur
IL-1R $\alpha$ , sIL-1 récepteur, sTNFR, NF- $\kappa$ B et/ou AP-1 bloquant*, anticorps anti-cytokine	Érosion du cartilage et inflammation
IL-4, -10, -12, -13, IFN $\beta$ , vIL-10	Déviations immunitaires
TGF $\beta$ , CTLA4 soluble, CD40, anticorps des antigènes de surface des lymphocytes T et B	Immunosuppression

**Tableau II.** Gènes codant pour des protéines potentiellement utiles dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. \* AP-1 bloquant signifie bloqueur du facteur nucléaire AP-1. Ce facteur nucléaire est, entre autre, actif en présence d'inflammation via la voie des MAP-kinases.

### Traitement des maladies ostéo-articulaires par thérapie génique : quels problèmes, quelles solutions ?

Tout traitement thérapeutique comporte potentiellement un risque pour le patient. La thérapie génique, en ce sens, ne fait pas exception à la règle. Afin de minimiser ces risques, il est indispensa-

ble de comprendre les techniques de transfert de gène et les effets biologiques qui y sont associés. La transduction de cellules *in vivo* est généralement bien tolérée, et les problèmes pathologiques et immunologiques parfois décrits sont majoritairement dus à l'expression de protéines virales. Néanmoins, une réponse immunitaire cellulaire dirigée contre les cellules transduites ou une réponse humorale avec apparition d'anticorps contre la protéine thérapeutique peuvent être observées. La possibilité d'une toxicité de la protéine transgénique n'est pas non plus à exclure. L'utilisation, lorsque cela est possible, d'un transgène dont la pharmacocinétique et la cytotoxicité sont connues (IL-1Ra, sTNFR, etc.) simplifie au moins ce dernier point.

La suspension ou l'adaptation d'un protocole en fonction de l'évolution de la maladie est parfois nécessaire lors d'un traitement thérapeutique. Il est donc important de pouvoir réguler de façon précise et délibérée l'expression du transgène. Le système *tetracycline-on* (Tet-ON), où la transcription du transgène est dépendante de la présence d'un ligand externe administrable par voie orale, reste l'un des plus étudiés. Son utilisation dans un modèle d'arthrite par le collagène a montré une expression du transgène 10 fois supérieure en présence du ligand (doxycycline) et prévient la progression de la maladie [32]. Les nouvelles versions (Figure 1), utilisant notamment la co-expression de cassettes bi-cistroniques via un IRES (*internal ribosome entry site*), sont prometteuses. Chez le singe [33] et la souris [34], ces constructions permettent d'obtenir un niveau d'expression basale du transgène négligeable en l'absence de doxycycline, ainsi qu'un contrôle strict de l'expression du transgène sur plusieurs années. Cepen-

dant, le potentiel immunogène de ce système fait l'objet de résultats contradictoires [35, 36]. Afin de s'affranchir de ce problème, le système inducible par la rapamycine (Rp) n'utilise que des éléments d'origine humaine [37, 38]. Il est fondé sur la dimérisation de facteurs de transcription en présence de Rp. Bien que tout aussi intéressant que le système Tet-ON en terme d'induction et d'expression basale, ce système nécessite toutefois l'administration de deux vecteurs (Figure 2). De plus, la Rp est immunosuppressive et sa biodisponibilité après ingestion orale limitée [39]. Le développement d'analogues non immunosuppresseurs de la Rp semble encourageant [40]. Enfin, d'autres systèmes présentent également un intérêt pour le traitement par thérapie génique des maladies ostéo-articulaires : citons notamment les promoteurs hybrides, auto-inductibles par un stimulus inflammatoire [41, 42]. Ces constructions sont fondées sur la présence de sites de fixation sur l'ADN pour des facteurs de transcription communs aux différentes voies signalétiques de l'inflammation (NFκB [*nuclear factor κB*], AP1 [*activating protein 1*], STAT3 [*signal transducer and activator of transcription 3*], etc.). Néanmoins, une expression inappropriée du transgène (notamment lors d'une infection) reste possible, et constitue indéniablement un désavantage à l'utilisation de ces systèmes.

Vecteurs	Intégration	Avantages	Inconvénients
Non viral	Non	Facile à produire et peu coûteux Taille du transgène illimitée Transfection indépendante du cycle cellulaire	Faible efficacité de transfection <i>in vivo</i>
Adénovirus	Non	Facile à produire Transduction indépendante du cycle cellulaire	Immunogène et inflammatoire Nécessite la présence membranaire du récepteur des adénovirus et des coxsackievirus (CAR)
Gutless adénovirus	Non	Théoriquement peu immunogène Transduction indépendante du cycle cellulaire Taille du transgène (< 37 kb)	Très difficile à produire
<i>Herpes simplex virus</i>	Non	Transduction indépendante du cycle cellulaire Taille du transgène (< 35 kb)	Inflammatoire et cytotoxique
Rétrovirus	Oui	Intégration du transgène Longue durée d'expression du transgène	Transduction limitée aux cellules en division Insertion mutagène possible Efficacité complexe <i>in vivo</i>
Lentivirus	Oui	Intégration du transgène Transduction indépendante du cycle cellulaire Longue durée d'expression du transgène	Insertion mutagène possible Difficile à produire
AAV	Possible	Associé à aucune maladie chez l'homme Nombreux sérotypes disponibles Longue durée d'expression possible	Taille du transgène limitée (< 4 kb) Difficile à produire

Tableau III. Propriétés des différents vecteurs.

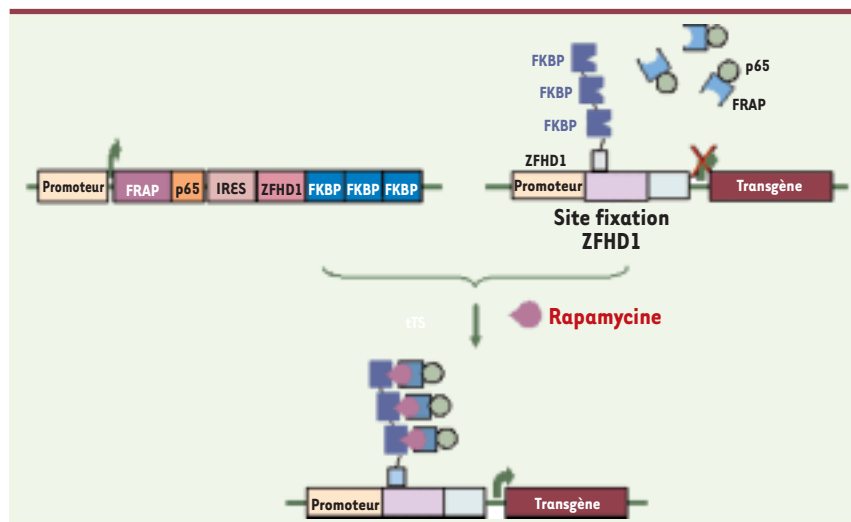
Un protocole de thérapie génique efficace se doit d'achever sans cytotoxicité la/les protéines transgéniques dans le/les tissus cible(s) à des doses thérapeutiques. De ce fait, les propriétés intrinsèques de chaque vecteur vont orienter, conditionner leurs applications. La faible efficacité de transfection des tissus articulaires *in vivo* par les vecteurs d'origine non virale [43, 44] oriente désormais un nombre croissant d'équipes scientifiques vers l'utilisation de vecteurs viraux recombinants intégratifs ou non intégratifs (Tableau III). En présence d'une cassette d'expression adéquate, les vecteurs intégratifs [45] per-

mettent le maintien de l'expression de la protéine transgénique au cours des divisions successives de la cellule transduite. Cette intégration peut être intéressante dans le traitement de certaines pathologies chroniques articulaires. En effet, une amplification de l'expression du transgène a été observée lors de la formation du pannus après administration intra-articulaire d'un lentivirus recombinant dans un modèle d'arthrite induite par l'IL-1, suggérant une autorégulation de l'expression transgénique en présence d'inflammation [14]. Le pouvoir infectieux des lentivirus qui, contrairement aux rétrovirus classiques dérivés du Mo-MLV (*moloney murine leukemia virus*), est indépendant du cycle cellulaire, représente un atout lors de stratégies *in vivo* en permettant l'injection directe du vecteur

dans l'articulation. Cependant, malgré la déletion de toutes les séquences pathogènes et de l'enveloppe du VIH (virus de l'immunodéficience humaine), un obstacle d'ordre psychologique limite encore leur développement clinique pour le traitement de pathologies ostéo-articulaires, la plupart non létales.

Les AAV présentent le profil sanitaire le plus rassurant (Tableau III). Ils ne sont associés à aucune pathologie, sont peu immunogènes et non inflammatoires [46, 47]. Malgré la possibilité d'insertion aléatoire du génome de l'AAV recombinant, cette fréquence reste faible et n'a pas pour l'instant soulevé de questions sanitaires. Il a également été montré qu'une protéine transgénique peut être exprimée plusieurs années après l'administration d'AAV recombinants [48-50], notamment lors de la modification génétique de tissu à faible régénération comme le muscle. Plusieurs points de désaccord persistent néanmoins

après administration intra-articulaire d'AAV recombinants, notamment en ce qui concerne l'efficacité de ces vecteurs à transduire une membrane synoviale saine versus enflammée, et quant à la durée d'expression du transgène au sein de l'articulation [51]. Toutefois, un essai clinique de phase I, réalisé chez des patients atteint de PR (*Targeted genetics corporation*, Seattle, WA, États-Unis), a montré d'une part une bonne tolérance lors de l'administration intra-articulaire de  $10^{11}$  particules/ml d'un AAV-2 exprimant le TNFR: Fc, et d'autre part une diminution, sur plusieurs mois, du volume des articulations traitées [52]. Le pouvoir de transduction intra-articulaire des AAV recombinants diffère néanmoins d'un sérotype à l'autre en fonction de l'espèce : ainsi, les AAV de type 5 transduisent de manière plus efficace *in vitro* les synoviocytes humains que les AAV de sérotype 2 [53]. Par ailleurs, le développement de nouveaux variants AAV auto-complément-



**Figure 2. Le système inducible par la Rapamycine (Rp).** En présence de Rp, il y a formation d'un hétérodimère entre l'immunophiline (FKBP) et la protéine FKBP associée à la Rp (FRAP). Lorsque FKBP est fusionnée avec un zinc-finger homeodomain fusion (ZFHD1) et FRAP à un élément activateur p65, la présence de Rp permet la transcription du transgène sous contrôle d'un promoteur dépendant de la présence de ZFHD1-FKBP.

<b>Désordres génétiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Osteogenesis imperfecta</i></li> <li>Mucopolysaccharidoses</li> <li>Maladie de Gaucher</li> <li>Syndrome de Stickler</li> <li>Dystrophie musculaire</li> </ul>
<b>Chirurgie orthopédique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fracture osseuse non jointive</li> <li>Descellement aseptique</li> <li>Ostéo-intégration</li> <li>Régénération des disques intervertébraux</li> <li>Fusion vertébrale</li> </ul>
<b>Médecine sportive</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Réparation du cartilage</li> <li>Réparation des ligaments</li> <li>Réparation des ménisques</li> </ul>
<b>Autres applications</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ostéosarcomes</li> <li>Chondrosarcomes</li> <li>Ostéoporose</li> </ul>

**Tableau IV. Autres applications ostéo-articulaires possibles de la thérapie génique.**

taires [54] permet l'obtention de niveaux d'expression intra-articulaire élevés, et ce même en absence d'inflammation. Ces concentrations sont de l'ordre du ng/ml de protéine transgénique après injection intra-articulaire de  $10^{11}$  particules d'AAV-5 ou -8 exprimant le TNFR chez le rat (données personnelles).

## Conclusions et perspectives

La connaissance préalable des données cliniques, pharmacocinétiques et de biodistribution des BRM, tels que le Kineret® (IL-1R $\alpha$ ) et l'Enbrel® (sTNFR), a accéléré le développement de protocoles cliniques utilisant le transfert de l'ADNc codant pour ces protéines anti-inflammatoires. La PR a été la première des conditions ostéo-articulaires à être la cible de traitements par thérapie génique. Le premier essai clinique de phase I a été réalisé en 1996 chez 9 femmes dont les stades avancés de PR nécessitaient un remplacement chirurgical des articulations métacarpophalangiennes 2 à 5. Cet essai utilisait une stratégie *ex vivo*, nécessitant le prélèvement de cellules sur le patient, leur modification génétique en laboratoire par un rétrovirus exprimant l'IL-1R $\alpha$ , puis leur réimplantation dans les articulations atteintes. Une semaine après, l'expression du transgène a été détectée et aucun effet secondaire n'a été observé [55]. Dix ans se sont écoulés depuis, et 8 essais cliniques impliquant des techniques de transfert de gène ont été réalisés [51]. Cinq des 8 essais (tous de phase I, dont celui de la *Targeted genetics corporation*) étaient fondés sur l'administration locale intra-articulaire de vecteur. Dans les 3 autres essais (phases I, IIa ou II), il s'agissait d'une administration intraveineuse ou sous-cutanée d'ARN antisens ciblant le TNF. Bien que les résultats finaux n'aient pas encore été publiés, les critères sanitaires ont dans tous les cas été remplis et aucun effet secondaire n'a pour le moment été reporté. Tous ces essais cliniques ciblaient cependant la PR et, en dépit du nombre croissant de personnes atteintes d'arthrose et de l'absence de « médicaments » efficaces, aucune étude clinique de thérapie génique appliquée au traitement de cette maladie n'a pour l'instant été conduite. Toutefois, un essai de phase II fondé sur l'injection intra-articulaire d'un AAV exprimant l'IL-1R $\alpha$  dans une articulation arthrosique est actuellement en préparation (communication personnelle du Pr Evans).

Les résultats prometteurs obtenus notamment pour le traitement de la PR ont permis l'application de techniques de transfert de gène à d'autres pathologies du système locomoteur (*Tableau IV*). Au vu des résultats encourageants, les essais cliniques par transfert de gène(s) pour les différentes pathologies ostéo-articulaires devraient se multiplier dans un proche avenir.  $\diamond$

## SUMMARY

### Gene therapy for osteoarticular disorders

Osteoarticular disorders are the major cause of disability in Europe and North America. It is estimated that rheumatoid arthritis affects 1 % of the population and that more than two third of people over age 55 develop osteoarthritis. Because there are no satisfactory treatments, gene therapy offers a new therapeutic approach. The delivery of cDNA encoding anti-arthritic proteins to articular cells has shown therapeutic efficacy in numerous animal models *in vivo*. Through the development and the experi-

mental progresses that have been made for both rheumatoid arthritis and osteoarthritis, this review discusses the different gene therapy strategies available today and the safety issues with which they may be associated. Among the different vectors available today, adeno-associated virus seems the best candidate for a direct *in vivo* gene delivery approach for the treatment of joint disorders.  $\diamond$

## GLOSSAIRE

- AFSSAPS** : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé  
**AAV** : *adeno-associated virus*  
**AINS** : anti-inflammatoire non stéroïdien  
**BMP** : *bone morphogenic protein*  
**BRM** : protéines modificatrices de la réponse biologique  
**COX** : cyclo-oxygénase  
**CSM** : cellule souche mésenchymateuse  
**DMARD** : médicaments modifiant l'affection rhumatismale  
**DOX** : doxycycline  
**GFAT** : glutamine : fructose 6 phosphate-amido-transférase  
**IGF** : *insulin-like growth factor*  
**IFN $\beta$**  : interféron  $\beta$   
**IL-1** : interleukine-1  
**IL-1R $\alpha$**  : récepteur antagoniste de l'IL-1  
**IRES** : *internal ribosome entry site*  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**Mo-MLV** : *Moloney murine leukemia virus*  
**NF- $\kappa$ B** : facteur nucléaire kappa B  
**Rp** : rapamycine  
**PR** : polyarthrite rhumatoïde  
**sTNFR** : récepteur soluble du TNF  
**Tet-ON** : système *tetracycline-on*  
**TGF $\beta$**  : *transforming growth factor  $\beta$*   
**TNF** : *tumor necrosis factor*  
**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine

## RÉFÉRENCES

1. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000 ; 288 : 669-72.
2. Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 2004 ; 364 : 2181-7.
3. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003 ; 302 : 415-9.
4. Palmer GD, Steinert A, Pascher A, et al. Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells *in vitro*. *Mol Ther* 2005 ; 12 : 219-28.
5. Gouze JN, Gouze E, Palmer GD, et al. A comparative study of the inhibitory effects of interleukin-1 receptor antagonist following administration as a recombinant protein or by gene transfer. *Arthritis Res Ther* 2003 ; 5 : R301-9.
6. Makarov SS, Olsen JC, Johnston WN, et al. Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 402-6.

7. Sant SM, Suarez TM, Moalli MR, et al. Molecular lysis of synovial lining cells by *in vivo* herpes simplex virus-thymidine kinase gene transfer. *Hum Gene Ther* 1998; 9 : 2735-43.
8. Goossens PH, Schouten GJ, 't Hart BA, et al. Feasibility of adenovirus-mediated nonsurgical synovectomy in collagen-induced arthritis-affected rhesus monkeys. *Hum Gene Ther* 1999; 10 : 1139-49.
9. Yao Q, Glorioso JC, Evans CH, et al. Adenoviral mediated delivery of FAS ligand to arthritic joints causes extensive apoptosis in the synovial lining. *J Gene Med* 2000; 2 : 210-9.
10. Zhang H, Yang Y, Horton JL, et al. Amelioration of collagen-induced arthritis by CD95 (Apo-1/Fas)-ligand gene transfer. *J Clin Invest* 1997; 100 : 1951-7.
11. Chan JM, Villarreal G, Jin WW, et al. Intraarticular gene transfer of TNFR : Fc suppresses experimental arthritis with reduced systemic distribution of the gene product. *Mol Ther* 2002; 6 : 727-36.
12. Zhang HG, Xie J, Yang P, et al. Adeno-associated virus production of soluble tumor necrosis factor receptor neutralizes tumor necrosis factor alpha and reduces arthritis. *Hum Gene Ther* 2000; 11 : 2431-42.
13. Pan RY, Chen SL, Xiao X, et al. Therapy and prevention of arthritis by recombinant adeno-associated virus vector with delivery of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2000; 43 : 289-97.
14. Gouze E, Pawliuk R, Gouze JN, et al. Lentiviral-mediated gene delivery to synovium : potent intra-articular expression with amplification by inflammation. *Mol Ther* 2003; 7 : 460-6.
15. Lubberts E, Joosten LA, van Den Besselaar L, et al. Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction. *J Immunol* 1999; 163 : 4546-56.
16. Setoguchi K, Misaki Y, Araki Y, et al. Antigen-specific T cells transduced with IL-10 ameliorate experimentally induced arthritis without impairing the systemic immune response to the antigen. *J Immunol* 2000; 165 : 5980-6.
17. Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, et al. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* 1994; 94 : 2307-16.
18. Nixon AJ, Haupt JL, Frisbie DD, et al. Gene-mediated restoration of cartilage matrix by combination insulin-like growth factor-1/interleukin-1 receptor antagonist therapy. *Gene Ther* 2005; 12 : 177-86.
19. Pelletier JP, Caron JP, Evans C, et al. *In vivo* suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. *Arthritis Rheum* 1997; 40 : 1012-9.
20. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, et al. Treatment of experimental equine osteoarthritis by *in vivo* delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther* 2002; 9 : 12-20.
21. Zhang X, Mao Z, Yu C. Suppression of early experimental osteoarthritis by gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10. *J Orthop Res* 2004; 22 : 742-50.
22. Li WJ, Tuli R, Okafor C, et al. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2005; 26 : 599-609.
23. Pascher A, Palmer GD, Steinert A, et al. Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Ther* 2004; 11 : 133-41.
24. Nakamura Y, Nawata M, Wakitani S. Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders. *Am J Pathol* 2005; 167 : 97-105.
25. Tyler JA. Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J* 1989; 260 : 543-8.
26. Lafeber FP, van Roy HL, van der Kraan PM, et al. Transforming growth factor-beta predominantly stimulates phenotypically changed chondrocytes in osteoarthritic human cartilage. *J Rheumatol* 1997; 24 : 536-42.
27. Tchetina EV, Squires G, Poole AR. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. *J Rheumatol* 2005; 32 : 876-86.
28. Palmer G, Pascher A, Gouze E, et al. Development of gene-based therapies for cartilage repair. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2002; 12 : 259-73.
29. Gelse K, Jiang QJ, Aigner T, et al. Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer. *Arthritis Rheum* 2001; 44 : 1943-53.
30. Gouze JN, Bianchi A, Becuwe P, et al. Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level, and by inhibiting the NF-kappa B pathway. *FEBS Lett* 2002; 510 : 166-70.
31. Gouze JN, Gouze E, Palmer GD, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase antagonizes the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12 : 217-24.
32. Perez N, Plence P, Millet V, et al. Tetracycline transcriptional silencer tightly controls transgene expression after *in vivo* intramuscular electrotransfer : application to interleukin 10 therapy in experimental arthritis. *Hum Gene Ther* 2002; 13 : 2161-72.
33. Lamartina S, Silvi L, Roscilli G, et al. Construction of an rtTA2(s)-m2/tts(kid)-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates. *Mol Ther* 2003; 7 : 271-80.
34. Salucci V, Scarito A, Aurisicchio L, et al. Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system. *Gene Ther* 2002; 9 : 1415-21.
35. Favre D, Blouin V, Provost N, et al. Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J Virol* 2002; 76 : 11605-11.
36. Latta-Mahieu M, Rolland M, Caillet C, et al. Gene transfer of a chimeric trans-activator is immunogenic and results in short-lived transgene expression. *Hum Gene Ther* 2002; 13 : 1611-20.
37. Wang J, Voutetakis A, Papa M, et al. Rapamycin control of transgene expression from a single AAV vector in mouse salivary glands. *Gene Ther* 2006; 13 : 187-90.
38. Rivera VM, Clackson T, Natesan S, et al. A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med* 1996; 2 : 1028-32.
39. Xu ZL, Mizuguchi H, Mayumi T, Hayakawa T. Regulated gene expression from adenovirus vectors : a systematic comparison of various inducible systems. *Gene* 2003; 309 : 145-51.
40. Chong H, Ruchatz A, Clackson T, et al. A system for small-molecule control of conditionally replication-competent adenoviral vectors. *Mol Ther* 2002; 5 : 195-203.
41. van de Loo FA, de Hooge AS, Smeets RL, et al. An inflammation-inducible adenoviral expression system for local treatment of the arthritic joint. *Gene Ther* 2004; 11 : 581-90.
42. Bakker AC, van de Loo FA, Joosten LA, et al. C3-Tat/HIV-regulated intraarticular human interleukin-1 receptor antagonist gene therapy results in efficient inhibition of collagen-induced arthritis superior to cytomegalovirus-regulated expression of the same transgene. *Arthritis Rheum* 2002; 46 : 1661-70.
43. Li S, Ma Z. Nonviral gene therapy. *Curr Gene Ther* 2001; 1 : 201-26.
44. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. The 2003 Nicolas Andry Award. Orthopaedic gene therapy. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 316-29.
45. Kim SH, Kim S, Robbins PD. Retroviral vectors. *Adv Virus Res* 2000; 55 : 545-63.
46. Smith-Arica JR, Bartlett JS. Gene therapy : recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Cardiol Rep* 2001; 3 : 43-9.
47. Zhang YC, Powers M, Wasserfall C, et al. Immunity to adeno-associated virus serotype 2 delivered transgenes imparted by genetic predisposition to autoimmunity. *Gene Ther* 2004; 11 : 233-40.
48. Bouchard S, MacKenzie TC, Radu AP, et al. Long-term transgene expression in cardiac and skeletal muscle following fetal administration of adenoviral or adeno-associated viral vectors in mice. *J Gene Med* 2003; 5 : 941-50.
49. Rivera VM, Gao GP, Grant RL, et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 2005; 105 : 1424-30.
50. Stieger K, Le Meur G, Lasne F, et al. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol Ther* 2006; 13 : 967-75.
51. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Gene therapy for arthritis : What next ? *Arthritis Rheum* 2006; 54 : 1714-29.
52. Heald A, Pate G. *Clinical studies of intra-articular administration of a recombinant adeno-associated vector containing a TNF-antagonist gene in inflammatory arthritis*. Baltimore : ASGT 9<sup>th</sup> Annual Meeting, 2006.
53. Apparailly F, Khoury M, Vervordeldonk MJ, et al. Adeno-associated virus pseudotype 5 vector improves gene transfer in arthritic joints. *Hum Gene Ther* 2005; 16 : 426-34.
54. McCarty DM, Fu H, Monahan PE, et al. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction *in vivo*. *Gene Ther* 2003; 10 : 2112-8.
55. Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, et al. Gene transfer to human joints : progress toward a gene therapy of arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 : 8698-703.

**TIRÉS À PART**  
J.N. Gouze