médecine/sciences 1999 ; 15 : 759-60

Transduction de cellules souches hématopoïétiques avec des vecteurs lentiviraux : magie ou aventure ?

La modification génétique de cellules hémato-lymphoïdes repose sur la transduction de cellules souches hématopoïétiques, population cellulaire dotée de la propriété unique d'autorenouvellement perpétué et de maturation vers les différentes lignées du sang circulant. Les cellules souches capables de reconstitution à long terme ne sont identifiables que sur des critères fonctionnels : la mise en évidence de leur capacité de produire, dans le contexte d'une greffe, autologue ou allogénique, l'ensemble des lignées hématopoïétiques lymphoïdes et myéloïdes, et ce pendant une période prolongée *(m/s 1995, n° 1, p. 11)*. Les travaux convergents de nombreuses équipes accréditent l'hypothèse que, en situation d'équilibre hématologique, la majorité des « vraies » cellules souches totipotentes sont dans un état de repos mitotique (phase G0 ou G1 du cycle cellulaire). Avec les vecteurs rétroviraux traditionnels, l'intégration du transgène ne peut s'effectuer que dans des cellules en mitoses. A ce jour, les tentatives de modification génétique des cellules souches se sont donc avérées très décevantes dans la mesure où la préincubation de cellules présumées souches avec des facteurs de croissance a pour corollaire l'induction du processus de différenciation et la perte de leur propriété fondamentale de reconstitution hématopoïétique à long terme *(m/s 1996, n° 1, p. 60)*, et peut être l'altération du potentiel de *homing* [1]. A la différence des rétrovirus, les lentivirus sont capables, après avoir pénétré dans le cytoplasme, d'accéder au noyau des cellules cibles en l'absence de rupture de la membrane nucléaire *(m/s 1996, n° 6, p. 818)*. L'accomplissement du cycle infectieux ne requiert pas nécessairement de mitoses [2]. Ainsi, l'intérêt des vecteurs dérivés du VIH vient de leur capacité de transduire des cellules souches soit quiescentes soit différenciées comme les neurones [2].

Deux équipes américaines, travaillant l'une sur la biologie des cellules souches hématopoïétiques humaines [3] et la seconde sur la vectorologie [4], rapportent à quelques semaines d'intervalle, des données expérimentales convergentes, démontrant la réalité d'une modification génétique stable de cellules fonctionnellement proches des cellules souches, aboutissant à l'expression à long terme d'un gène marqueur (GFP, *green fluorescnt protein*) dans la descendance de ces cellules. Le groupe d'Irving Weissman a utilisé des cellules humaines $CD34^+Lin^-Thy\text{-}1^+CD38^{-/lo}$, purifiées à partir du sang périphérique, dont la fonction a été évaluée exclusivement *in vitro* dans des cultures à long terme. Les cellules ont été infectées en parallèle avec un lentivecteur dérivé du VIH, et un vecteur rétroviral traditionnel dérivé de Moloney (MuLV). Lorsque les cellules sont exposées au surnageant viral pendant quelques heures en l'absence de toute stimulation préalable, seul le lentivecteur conduit à l'expression de la GFP dans 40 % des cellules nucléées en moyenne après 4 jours et l'expression de la GFP persiste dans la descendance des clones GFP^+ cultivés 5 semaines. En revanche, lorsque les cellules cibles sont préalablement stimulées par des cytokines, le niveau de transduction obtenu avec les deux types de vecteurs est comparable, autour de 30 %, l'expression de la GFP étant plus importante avec le vecteur MuLV. L'équipe d'Inder Verma [3] décrit des résultats *in vitro* similaires, et y ajoute des données de reconstitution hématologique fonctionnelle chez la souris NOD/SCID irradiée. Des cellules humaines GFP^+ sont détectées dans les tissus des souris entre 8 et 22 semaines après la greffe de cellules $CD34^+$ de sang de cordon infectées avec un lentivirus *(figure 1)*. Le pourcentage de cellules nucléées d'origine humaine exprimant la GFP est d'environ 10 %, dans la moelle, la rate et le sang périphérique des souris. Environ 40 % des progéniteurs myéloïdes (formant colonies, ou CFC, *colony forming cells*) issus de la moelle des souris NOD-SCID sont aussi GFP^+. La vérification de la transduction par un test moléculaire (PCR à partir des cellules des colonies individuelles) permet de conclure à une corrélation satisfaisante, une minorité de colonies GFP^- donnant un signal d'intégration moléculaire. Au contraire, les cellules exposées quelques heures seulement et en l'absence de facteurs de croissance à un vecteur MuLV de référence ne donnent naissance à aucune cellule GFP^+ dans les souris NOD-SCID. L'observation de cellules GFP^+ dans la moelle de souris NOD-SCID doit cependant être nuancée : le niveau d'expression de la GFP dans le modèle NOD-SCID n'est convaincant que dans la lignée lymphoïde B (qui représente > 80 % des cellules humaines) et il est difficile de conclure sur la seule présence de cellules humaines dans les souris NOD-SCID, même 5 mois après la greffe (et surtout s'il s'agit de cellules $CD19^+$) à l'infection de cellules souches totipotentes.

L'intérêt essentiel de ces vecteurs dérivés d'HIV est de pouvoir transduire des cellules souches hématopoïétiques primitives en l'absence de toute manipulation potentiellement délétère. Or ces deux articles ne nous convainquent pas totalement sur la réalité de l'infection de cellules quiescentes. Dans l'article de *Science*, les cellules sont incubées à une très forte concentration cellulaire pendant l'infection (4×10^6 cellules/ml) et il y a fort à parier qu'elles ne sont pas toutes en repos mitotique. Or le lentivecteur peut aussi infecter et s'intégrer dans des cellules dont les divisions sont stimulées par des facteurs de croissance. Une troisième équipe,

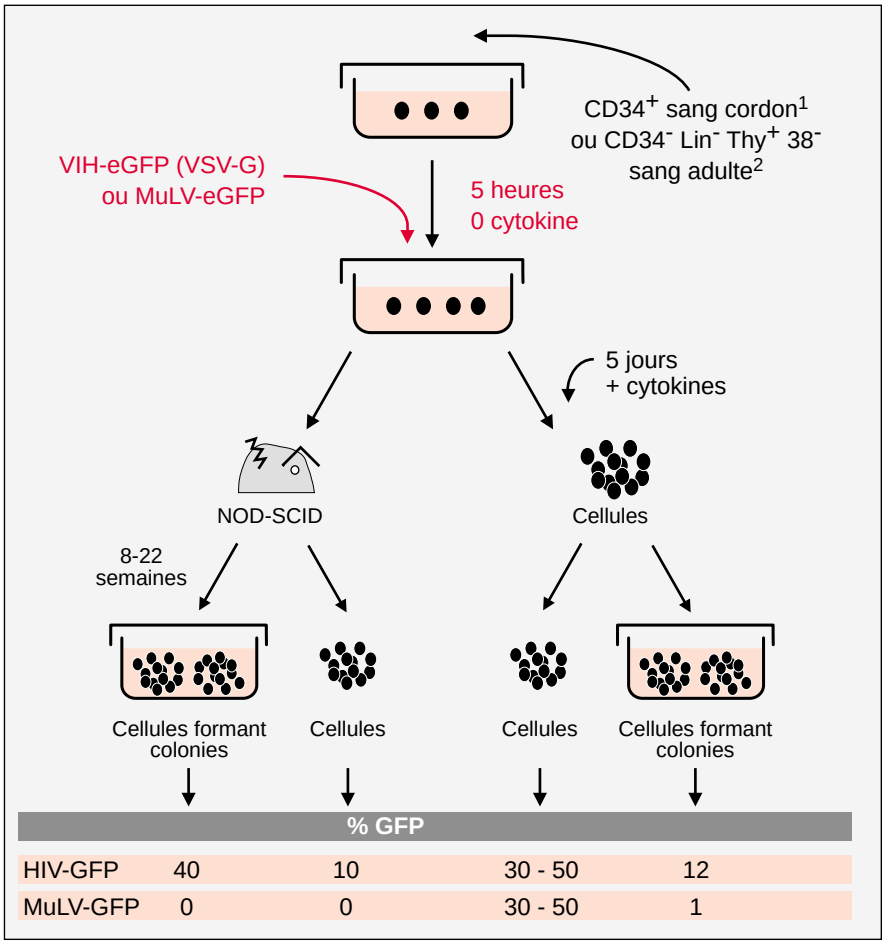

Figure 1. ***Transduction de précurseurs hématopoïétiques humains.*** *Données comparatives entre lentivirus dérivés du VIH et vecteurs rétroviraux murins sur des cellules non stimulées ou après induction d'une prolifération. (1)* in vitro *et chez la souris NOD/SCID; (2)* in vitro.

celle de G Crooks à Los Angeles [5] confirme directement que les vecteurs lentiviraux infectent des cellules quiescentes. Cette équipe a comparé l'efficacité de transduction de cellules CD34+ ou CD34+/CD38− non seulement en fonction du vecteur (lentivirus/VSV, lentivirus déficient en intégrase, et MuLV/GALV) mais aussi en fonction de la position des cellules dans le cycle cellulaire, phase G0, G1, S/G2/M (marquage Ki-67/DAPI) et du nombre de divisions effectuées pendant l'infection (utilisation d'un marqueur fluorescent, PKH26). L'analyse de l'expression de GFP au cytofluoromètre, mais aussi de l'intégration virale par PCR dans la descendance des cellules CD34+CD38− infectées par le lentivirus confirment l'intégration dans environ 20-30 % des cellules très primitives. Ces résultats ont été confirmés dans des cultures réalisées à l'échelon unicellulaire, alors que dans les mêmes conditions, le virus murin (MLV/GALV ou MLV/VSV) ne transduit que 2 % des cellules.

Le groupe de G. Crooks [5] signale aussi la possibilité de pseudotransduction, particulièrement fréquente avec des vecteurs pseudotypés VSV et qui pouvait être suspectée aussi dans le travail de *Science*. Celle-ci est attestée à la fois par l'observation d'un pourcentage non négligeable (30-35 %) de cellules GFP+ après infection avec le vecteur déficient en intégrase et par l'observation d'une chute dans la proportion de cellules GFP+ après 7 jours de culture. Cela souligne l'importance de ne pas se contenter d'une analyse de l'expression précoce du transgène, mais d'y ajouter la réalisation de tests fonctionnels à long terme, représentatifs de la fonction de cellules souches à division lente.

Une interrogation persiste concernant la cinétique d'intégration du génome viral dans les cellules présumées quiescentes à l'origine. En effet, cette intégration intervient-elle d'emblée ou bien plus volontiers lors de la première mitose qui suivra la pénétration du virus, éventuellement à distance. Ces expériences témoignent d'un progrès incontestable avec la possibilité de modifier génétiquement des précurseurs hématopoïétiques en l'absence de préstimulation exogène. Mais de nombreux obstacles demandent à être levés avant d'envisager les applications thérapeutiques potentielles : obstacles technologiques, relatifs à la production des vecteurs et à la séparation des génomes des différents cadres de lecture codant pour les protéines virales ; obstacles liés à la nécessité d'assurer, par une meilleure connaissance de ces vecteurs, leur innocuité. Il apparaît prématuré d'enterrer les vecteurs rétroviraux traditionnels surtout s'il n'est pas exclu de définir des conditions de culture propices à l'amplification des cellules souches et préservant leur potentiel. D'un Graal à l'autre...

O.C.-H.

1. Szilvassy SJ, Bass MJ, Van Zant GV, Grimes B. Organ-selective homing defines engrafment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by *ex vivo* expansion. *Blood* 1999 ; 93 : 1557-66.
2. Naldini L, Blomer U, Gallay P, *et al. In vivo* gene delivery and stable transduction of non dividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996 ; 272 : 263-7.
3. Uchida N, Sutton RE, Friera AM, *et al.* HIV but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 11939-44.
4. Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE. Transduction of human CD34(+) cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 1999 ; 283 : 682-6.
5. Case SS, Price MA, Jordan CT, *et al.* Stable transduction of quiescent CD34+CD38− human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 2988-93.