

Myélofibrose par excès de thrombopoïétine

La thrombopoïétine (TPO), encore appelée ligand de Mpl ou MGDF (*megakaryocyte growth and development factor*), est une glycoprotéine de 70 kDa dont le gène a été identifié en 1994 [1]. C'est le régulateur physiologique principal de la production plaquettaire. Cette hormone est produite constitutivement par le foie et le rein et sa clairance plasmatique est directement fonction des masses plaquettaires et mégacaryocytaires. En effet, la protéine se fixe passivement sur ses récepteurs Mpl-R synthétisés à la surface de ces cellules (environ 200 récepteurs/plaquette), puis elle est internalisée et enfin dégradée. L'administration de la protéine recombinante à des animaux normaux augmente de plusieurs fois le nombre de plaquettes. Dans différents modèles de myélosuppression, l'injection de thrombopoïétine accélère la restauration plaquettaire et la reprise de l'érythropoïèse et augmente significativement la survie des animaux. Plusieurs études réalisées chez les primates et portant sur l'effet de la thrombopoïétine sur l'activation plaquettaire s'accordent pour conclure que la thrombopoïétine ne provoque pas d'agrégation plaquettaire spontanée mais sensibilise les plaquettes à l'action des agonistes de l'activation. Les premiers essais cliniques de phase I/II montrent que l'effet de la thrombopoïétine sur l'augmentation du nombre de plaquettes est très largement supérieur à tous les résultats obtenus avec d'autres cytokines stimulant la thrombopoïèse, comme IL-6 ou IL-11 ; en outre, contrairement à ces deux cytokines, l'administration de thrombopoïétine est très bien tolérée [2]. Cependant, plusieurs

études montrent que les cellules de la lignée mégacaryocytaire ne sont pas les seules cellules cibles de la thrombopoïétine. En particulier, les souris dont les gènes de la thrombopoïétine ou de son récepteur c-Mpl ont été invalidés par recombinaison homologue ont un déficit d'environ 50 % du nombre total des cellules hématopoïétiques progénitrices, incluant les progéniteurs primitifs; cela indique donc que l'action de la thrombopoïétine sur l'hématopoïèse est plus importante que l'on ne soupçonnait. On ne connaît pas actuellement les indications thérapeutiques possibles de la thrombopoïétine, mais il est raisonnable de penser que cette cytokine pourrait être utilisée pour améliorer les thrombopénies sévères associées aux traitements cytoréducteurs des chimiothérapies à fortes doses ou, éventuellement, pour stimuler la production plaquettaire dans les purpura thrombopéniques idiopathiques (PTI) dans lesquels la limitation de la production plaquettaire peut être un facteur d'aggravation. Dans ce contexte, plusieurs groupes ont créé différents modèles expérimentaux permettant d'explorer les éventuels effets secondaires nocifs d'une exposition prolongée du système hématopoïétique à de fortes doses de thrombopoïétine.

Administration prolongée de thrombopoïétine par voie systémique

Le modèle le plus simple consiste en l'injection quotidienne de thrombopoïétine par voie intrapéritonéale à des souris Balb/c [3]. Dans ces expériences, les souris reçoivent du PEG-rHuMGDF, une protéine recombi-

nante humaine tronquée, non glycosylée et dont la durée de vie *in vivo* est stabilisée par l'ajout d'une queue de polyéthylène glycol. Les animaux sont traités pendant 14 jours avec des doses croissantes de PEG-rHuMGDF de 1 mg/kg/jour à 500 mg/kg/jour. Les auteurs observent une thrombocytose, dépendante de la dose, décelable dès la plus faible dose de PEG-rHuMGDF à 1 mg/kg/jour et maximale aux doses de 50 à 500 mg/kg/jour; le nombre de plaquettes est alors multiplié par cinq. Les changements du volume plaquettaire moyen (MPV) sont complexes, de très grosses plaquettes étant observées à la dose maximale de 500 mg/kg/jour de PEG-rHuMGDF. Les souris présentent une leucocytose périphérique modérée et développent une splénomégalie essentiellement due à une hyperprolifération mégacaryocytaire et érythroblastique. On note une hématopoïèse extramédullaire dans différents organes. Dans la moelle osseuse, dès le deuxième jour après le début des injections, le nombre de mégacaryocytes et de cellules de la lignée granulocytaire augmente de manière considérable tandis que les érythroblastes et les lymphocytes sont sous-représentés. Une densification du réseau des fibres de réticuline sans dépôt de collagène est observée uniquement à la plus forte dose de PEG-rHuMGDF. A l'arrêt du traitement, la myélofibrose guérit spontanément.

Surexpression du gène de la thrombopoïétine par des vecteurs rétroviraux

Pour délivrer de manière permanente de fortes concentrations de

thrombopoïétine chez la souris, la séquence codante de la thrombopoïétine murine a été introduite dans un vecteur rétroviral sous le contrôle des LTR (*long terminal repeat*) du virus. Des particules infectieuses ont été produites en encapsidant des constructions dans la lignée GP + E86. L'hématopoïèse de souris irradiées par une dose létale a été reconstituée par une greffe de cellules médullaires infectées par ces rétrovirus recombinants.

Dans le premier modèle décrit par Yan *et al.* (Thousand Oaks, CA, USA) [4, 5], une augmentation importante de la thrombopoïétine plasmatique (de 15 à 27 fois) est détectable 7 et 14 jours après la greffe. Un mois après la greffe, les concentrations de thrombopoïétine circulante deviennent indétectables bien que l'activité biologique de la protéine soit présente dans du milieu conditionné préparé à partir de splénocytes. Le nombre de plaquettes augmente très rapidement après la greffe, pour atteindre des chiffres cinq fois supérieurs à la normale à la cinquième semaine ($5 \times 10^9/\text{ml}$). Ces valeurs restent constantes pendant les 16 semaines d'observation. Pour expliquer l'augmentation apparemment transitoire de la thrombopoïétine plasmatique, les auteurs suggèrent qu'il existerait un état d'équilibre entre la thrombopoïétine produite et sa capture par l'augmentation de la masse plaquettaire. À la périphérie, il existe une anémie modérée, mais

aucune modification significative du nombre des cellules nucléées. Les souris reconstituées développent une hématopoïèse extramédullaire objectivée par une splénomégalie principalement due à une hyperplasie mégacaryocytaire et granulocytaire, la présence de foyers d'hématopoïèse et de nombreux mégacaryocytes dans divers organes et un nombre important de cellules progénitrices dans la circulation. Dix semaines après la greffe, la cavité médullaire des fémurs est complètement obturée par un dépôt dense de fibres de réticuline et le développement de nouvelles travées osseuses émergeant de la corticale. Malgré la thrombocytose qui reste stable, le développement de la myélofibrose et de l'ostéosclérose, les animaux restent actifs et en bonne santé pendant les 73 semaines de suivi [5].

En utilisant une stratégie similaire, Villeval *et al.* (Villejuif, France) ont obtenu un syndrome beaucoup plus sévère [6]. Comme dans le modèle précédent, les souris reconstituées avec des cellules médullaires surexprimant le gène de la thrombopoïétine ont une hyperplasie mégacaryocytaire et granulocytaire, une splénomégalie, une hématopoïèse extramédullaire, une myélofibrose et une ostéosclérose médullaire (*figure 1*). Cependant, les animaux développent aussi un syndrome myéloprolifératif létal chez 100 % des animaux (médiane de survie = sept mois). Dès la deuxième semaine après la greffe, les concen-

trations plasmatiques de thrombopoïétine sont extrêmement élevées (10 000 à 40 000 fois supérieures à la normale, soit 300 ng à 1,2 mg/ml contre < 10 pg/ml chez les contrôles) et elles restent constantes pendant les 12 mois d'observation. La maladie évolue en deux étapes distinctes. (1) Au cours des deux premiers mois après la greffe, le nombre de plaquettes et de leucocytes périphériques augmente respectivement d'un facteur 4 et 8, tandis que les valeurs des hématocrites sont légèrement diminuées. Le volume moyen des plaquettes est hétérogène avec la présence de plaquettes de très grande taille. L'examen histologique de la rate et de la moelle révèle une importante hyperplasie de mégacaryocytes et de polynucléaires, avec un net déficit en cellules de la lignée érythroblastique. (2) À partir du troisième mois après la greffe, les leucocytes, globules rouges et plaquettes périphériques décroissent, conduisant progressivement à une pancytopenie profonde. Dans la rate, on observe une myélofibrose parfois invalidante objectivée par un épaississement de la capsule conjonctive et un important épaississement du réseau de fibres de réticuline et de collagène, pouvant conduire à des secteurs de nécroses (*figure 2*). Dans les os, la corticale et les lamelles trabéculaires sont épaissies. Une importante ostéogenèse obture les cavités médullaires, réduisant fortement les zones d'hématopoïèse. Trois animaux sur 100 exami-

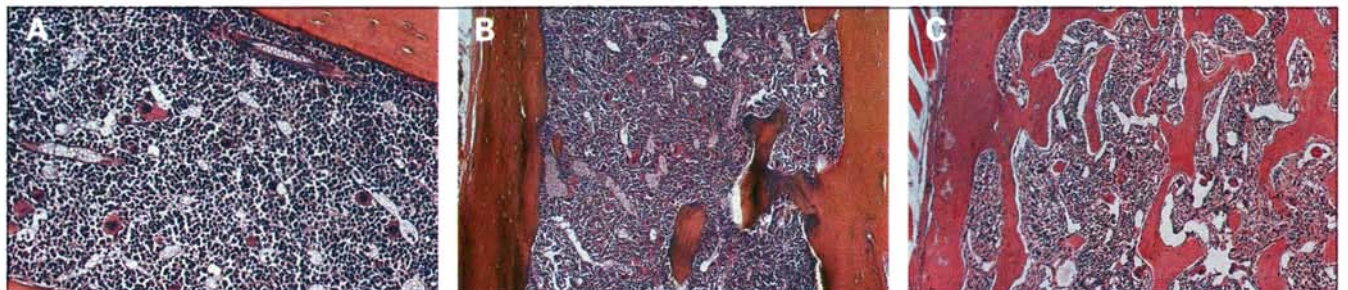


Figure 1. **Anatomopathologie de la moelle montrant l'évolution de la myélofibrose : coloration à l'hématéine éosine.** A. Fémur d'une souris témoin montrant l'aspect histologique d'une moelle normale (grossissement original $\times 250$). B. Fémur d'une souris prélevé deux mois après la greffe de cellules médullaires infectées par le rétrovirus MPZenTPO. On note l'apparition d'une néogenèse osseuse dans la cavité médullaire (grossissement original $\times 100$). C. Fémur d'une souris prélevé quatre mois après la greffe de cellules médullaires infectées par le rétrovirus MPZenTPO. La cavité médullaire est encombrée d'une construction osseuse réalisant une ostéosclérose (grossissement original $\times 100$).

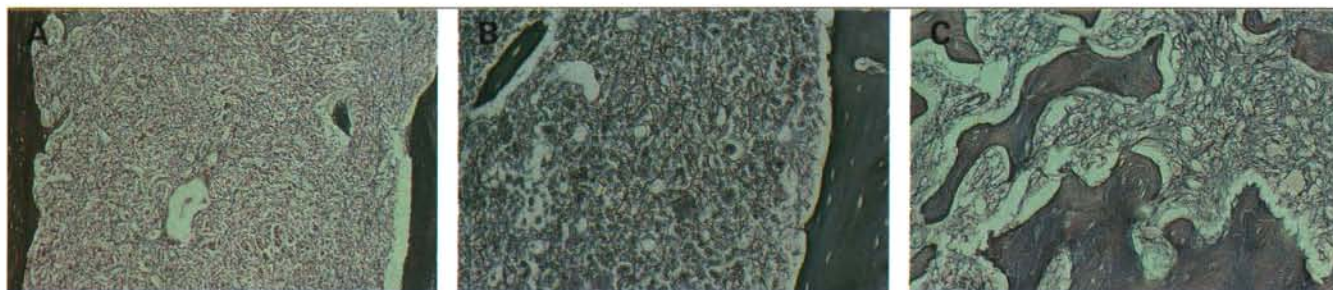


Figure 2. **Anatomopathologie de la moelle montrant l'évolution de la myélofibrose: coloration à l'argent par la méthode de Gordon Sweet qui met en évidence la trame réticulinique.** A. Fémur d'une souris témoin montrant l'aspect histologique d'une moelle normale (grossissement original $\times 100$). B. Fémur d'une souris prélevé deux mois après la greffe de cellules médullaires infectées par le rétrovirus MPZenTPO. On observe une densification franche de la trame réticulinique traduisant une myélofibrose réticulinique systématique (grossissement original $\times 250$). C. Fémur d'une souris prélevé quatre mois après la greffe de cellules médullaires infectées par le rétrovirus MPZenTPO. On observe une construction osseuse qui encombre la cavité médullaire, ainsi qu'un réseau réticulinique considérablement augmenté réalisant une myélofibrose mutilante. On peut noter par endroits le point de départ péri-osseux de certaines fibres de réticuline (grossissement original $\times 250$).

nés sont morts prématurément présentant un tableau clinique compatible avec une transformation blastique.

Les maladies obtenues par Yan *et al.* [4, 5] et Villeval *et al.* [6] ont des points en commun, mais l'évolution en est différente. Dans les deux études, il est montré que la maladie est transplantable chez des receveurs secondaires irradiés par une dose létale, ce qui indique que des cellules souches capables d'assurer la restauration hématopoïétique à long terme ont été effectivement infectées par le rétrovirus. Les niveaux de production différents de thrombopoïétine (non décelable après 14 jours dans le modèle de Yan *et al.* et environ 1 mg/ml pendant six mois dans le modèle de Villeval) peuvent probablement expliquer l'évolution différente dans ces deux modèles. Il faut noter que l'ADNc de la thrombopoïétine murine a été cloné dans le vecteur pMSCV2.2 sous le contrôle du LTR du MSCV (*murine stem cell virus*) dans les études de Yan [4], tandis que Villeval [6] a utilisé le vecteur MPZen2 qui contient les LTR du MSV (*myeloprolifératif sarcoma virus*).

Surexpression du gène de la thrombopoïétine par des vecteurs adénoviraux

Pour obtenir une production élevée mais transitoire de thrombopoïétine,

l'ADNc de la thrombopoïétine humaine a été introduit dans des vecteurs adénoviraux. Dans la première étude rapportée par Ohwada *et al.* (New York, NY, USA) [7], l'ADNc de la thrombopoïétine a été placé sous le contrôle du promoteur/*enhancer* du cytomégalo-virus (CMV) (AdCMV.TPO). Des souris Balb/c immunocompétentes ont reçu par voie sous-cutanée une dose unique (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 pfu) de virus recombinant. Les auteurs observent une augmentation transitoire du nombre de plaquettes dont l'intensité et la durée sont dépendantes de la dose de virus inoculée. Pour la dose maximale de 10^9 pfu, un nombre de plaquettes sept fois supérieur aux valeurs normales est atteint au 7^e jour (7×10^9 /ml). Au 20^e jour, le nombre de plaquettes est identique à celui des souris non traitées. Les analyses histologiques de la moelle et de la rate des souris traitées montrent une hyperplasie mégacaryocytaire sans signe de myélofibrose et d'ostéosclérose [7].

Dans l'étude réalisée par Abina *et al.* (Villejuif, France) [8], l'ADNc de la thrombopoïétine humaine a été cloné dans un vecteur adénoviral sous contrôle du LTR du virus de Rous (AdRSV.TPO). Il est reconnu que ce LTR donne une expression plus prolongée du transgène que le promoteur/*enhancer* du cytomégalo-virus. Deux types de souris, des souris

immunodéficientes SCID et des souris immunocompétentes DBA/2, ont reçu par voie intraveineuse des titres croissants d'AdRSV.TPO en une seule injection. Chez les souris immunocompétentes DBA/2 recevant environ 6×10^9 pfu de virus, on note une augmentation transitoire du nombre de plaquettes d'intensité et de cinétique semblables au travail précédent. A plus long terme (5 à 7 semaines), les animaux traités deviennent sévèrement thrombopéniques. Une étude plus approfondie montre que ces animaux développent des anticorps neutralisants dirigés non seulement contre la thrombopoïétine humaine codée par le transgène, mais aussi réactifs contre la thrombopoïétine murine (Abina *et al.*, manuscrit en cours de rédaction). Un résultat du même type a été observé par J. Leiden (Chicago, IL, USA) utilisant un vecteur adénoviral commandant la synthèse d'érythro-poïétine humaine chez la souris [9]. Chez les souris SCID immunodéficientes, l'injection de l'AdRSV.TPO provoque une augmentation de 40 000 fois (1,2 mg/ml) de la concentration de thrombopoïétine circulante qui peut être observée à la deuxième semaine et qui conduit à une élévation importante (7 fois) du nombre de plaquettes, à une leucocytose et à une anémie. Après la 6^e semaine, le nombre de plaquettes se normalise et on observe une

hématopoïèse extramédullaire dans de nombreux organes. La rate et la moelle sont le site d'une intense mégacaryopoïèse, puis le réseau de fibres de réticuline se densifie conduisant à une myélofibrose et une néogenèse osseuse.

Dans toutes les expériences utilisant des vecteurs adénoviraux, la disparition secondaire de l'hyperplaquetose est évidemment due à la présence transitoire des vecteurs qui restent extrachromosomiques. Ce phénomène peut être hâté par la réaction immunitaire contre le produit du transgène ou contre les antigènes viraux chez les souris non immunodéprimées [10].

Surexpression du gène de la thrombopoïétine par transgénèse

Pour créer des souris transgéniques surexprimant le gène de la thrombopoïétine, l'ADNc de la thrombopoïétine humaine a été placé sous le contrôle du promoteur de l'apolipoprotéine E pour cibler l'expression du transgène dans le foie [11]. Deux lignées fondatrices ont été obtenues. Celle qui a servi à la suite des expériences produit environ 3ng/ml de thrombopoïétine, l'autre lignée produisant 130pg/ml. Pendant la vie de ces souris, le nombre de plaquettes reste cinq fois supérieur à la normale (5×10^9 /ml). Les plaquettes issues de souris transgéniques ne sont pas activées spontanément mais elles sont plus sensibles à l'effet des agonistes de l'agrégation. On observe une légère leucocytose et une anémie dans le sang, une hyperplasie mégacaryocytaire dans les tissus hématopoïétiques, le foie et les poumons. Malgré l'hyperprolifération des mégacaryocytes, l'architecture de la moelle osseuse et de la rate reste apparemment normale sans signe de fibrose ou de néo-ostéogenèse.

Conclusions

Le but de ces travaux était de mettre en évidence d'éventuels effets secondaires nocifs liés à une utilisation permanente de thrombopoïétine. Les différents modèles expérimentaux décrits dans cette revue mon-

trent que ces effets peuvent être de modérés à très sévères, la sévérité étant directement dépendante de la concentration plasmatique de thrombopoïétine. Les souris transgéniques qui produisent trois nanogrammes de TPO/ml de plasma (300 fois la normale) vivent très bien avec un nombre de plaquettes 4 à 5 fois supérieur à la normale. Elles développent une hyperplasie mégacaryocytaire qui ne provoque ni myélofibrose, ni ostéosclérose [11]. A l'inverse, lorsque le gène de la thrombopoïétine est transféré dans des cellules hématopoïétiques par le biais d'un puissant vecteur rétroviral conduisant à une production de thrombopoïétine 40 000 fois supérieure à la normale (1,2mg/ml), les animaux développent un syndrome myéloprolifératif léthal dont les caractéristiques sont semblables à la myélofibrose primitive (splénomégalie myéloïde) de l'homme [6]. On a suggéré que le lieu de synthèse de la thrombopoïétine pouvait expliquer les différences entre les deux modèles : synthèse hépatique chez les souris transgéniques [11] et synthèse intramédullaire chez les souris irradiées et reconstituées [4, 6]. Les expériences d'Abina *et al.* [8] réfutent cette hypothèse. Lorsque l'AdRSV.TPO est inoculé par voie IV à des souris immunodéficientes SCID, l'expression du transgène est principalement hépatique et les animaux développent une myélofibrose [8]. La thrombopoïétine n'est probablement pas directement responsable de l'induction de la prolifération des fibroblastes dans un micro-environnement splénique et médullaire. En revanche, il est vraisemblable que des concentrations massives de thrombopoïétine plasmatique puissent agir sur les mégacaryocytes présents en nombre important dans ces organes, provoquant le relargage local de puissants médiateurs de la prolifération fibroblastique contenus dans leurs granules, comme le TGF β (*transforming growth factor*), le PDGF, (*platelet-derived growth factor*) le FGF (*fibroblast growth factor*) et le PF4 (*platelet factor 4*). Un paramètre encore mal exploré concerne les différences entre les espèces et entre les souches de souris. En particulier, il n'a pas

été rapporté de myélofibrose chez les primates non humains après des injections répétées de thrombopoïétine.

Il est difficilement pensable que, lors de l'utilisation clinique de la thrombopoïétine, des niveaux plasmatiques de l'ordre du mg/ml soient atteints de manière prolongée. Ces modèles ont cependant le mérite de montrer qu'un tel risque peut exister et qu'il faudra rester vigilant. En outre, ces études offrent également aux expérimentateurs des systèmes-modèles permettant de décrypter la cascade des événements impliqués dans le dépôt excessif de réticuline, puis du collagène dans la myélofibrose ; elles donnent aussi des outils pour chercher quels traitements pourraient être efficaces pour modifier l'évolution de cette maladie ■

Amine Abina
Jean-Luc Villeval
Karine Cohen-Solal
William Vainchenker
Françoise Wendling

Inserm U. 362, Institut Gustave-Roussy, Laboratoire hématopoïèse et cellules souches, Pavillon de recherche 1, 39, rue Camille-Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France.

Hedi Haddada

Cnrs URA 1301, Institut Gustave-Roussy, 39, rue Camille-Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France.

Micheline Tulliez

Service d'anatomopathologie, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

TIRÉS À PART

F. Wendling.

RÉFÉRENCES

1. Wendling F, Debili N, Methia N, Titeux M, Vainchenker W. Le gène codant pour la thrombopoïétine est cloné. *Med Sci* 1994; 10: 874-6.
2. O'Malley CJ, Rasko JEJ, Bassler RL, McGrath KM, Cebon J, Grigg AP, Hopkins W, Cohen B, O'Byrne J, Green MD, Fox RM, Berndt MC, Begley CG. Administration of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor to humans stimulates the production of functional platelets that show no evidence of *in vivo* activation. *Blood* 1996; 88: 3288-98.
3. Ulich TR, del Castillo J, Senaldi G, Kinsler O, Yin S, Kaufman S, Tarpley J, Choi E, Kirlet T, Hunt P, Sheridan WP. Systemic hematological effects of PEG-rHuMGDF-induced megakaryocyte hyperplasia in mice. *Blood* 1996; 87: 5006-15.
4. Yan XQ, Lacey D, Fletcher F, Hartley C, McElroy P, Sun Y, Xia M, Mu S, Seris C, Hill D, Hawley RG, McNiece IK. Chronic exposure to retroviral vector encoded MGDF (mpl-ligand) induces lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in mice. *Blood* 1995; 86: 4025-33.
5. Yan XQ, Lacey D, Hill D, Chen Y, Fletcher F, Hawley RG, McNiece IK. A model of myelofibrosis and osteosclerosis in mice induced by overexpressing thrombopoietin (mpl ligand): reversal of disease by bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 88: 402-9.
6. Villeval JL, Cohen-Solal K, Tulliez M, Giraudier S, Guichard J, Burstein SA, Cramer E, Vainchenker W, Wendling F. High thrombopoietin production by hemopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood* 1997 (sous presse).
7. Ohwada A, Rafii S, Moore MAS, Crystal RG. *In vivo* adenovirus vector-mediated transfer of the human thrombopoietin cDNA maintains platelet levels during radiation - and chemotherapy induced bone marrow suppression. *Blood* 1996; 88: 778-84.
8. Abina MA, Tulliez M, Debili N, Lacout C, Villeval JL, Pflumio F, Wendling F, Vainchenker W, Haddada H. Hematologic effects of a single injection of a recombinant adenovirus encoding human thrombopoietin in immunodeficient mice, and immunocompetent mice treated by a myeloablative regimen. *Blood* 1997 (sous presse).
9. Tripathy SK, Black HG, Goldwasser E, Leiden JM. Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nature Med* 1996; 2: 545-50.
10. Kahn A. Thérapie génique: le temps d'un premier bilan. *Med Sci* 1996; 1: 9-12.
11. Zhou W, Toombs CF, Zou T, Guo J, Robinson MO. Transgenic mice overexpressing human c-mpl ligand exhibit chronic thrombocytosis and display enhanced recovery from 5-fluorouracil or antiplatelet serum treatment. *Blood* 1997; 89: 1551-9.

BRÈVES

■ ■ ■ La kinase Abl est une cible de la protéine ATM déficiente chez les malades atteints d'ataxie télangiectasie. L'ataxie télangiectasie est une maladie caractérisée, comme son nom l'indique, par une ataxie, des télangiectasies, une dégénérescence neuronale, un désordre immunitaire et une incidence très augmentée de cancers. L'affection est récessive, mais les sujets hétérozygotes, qui peuvent représenter jusqu'à 1 % de la population, pourraient être à risque de développer des cancers (*m/s n°8, vol. 11, p. 1189*). Le gène *ATM* (muté dans l'ataxie télangiectasie) code pour une protéine appartenant à la famille des phosphatidylinositol-3-kinase, capable de phosphoryler des lipides et, peut-être, des protéines. Les cellules de sujets atteints d'ataxie télangiectasie ou de souris *Atm^{-/-}* sont hypersensibles aux radiations ionisantes, ce qui témoigne de ce que l'ataxie télangiectasie peut être rangée dans le groupe des réparatoses, ensemble de maladies héréditaires ayant comme point commun une fragilité du matériel génétique [1]. Par

ailleurs, la kinase c-Abl, produit du proto-oncogène *Abelson*, avait été elle aussi localisée dans la voie de la transmission du signal induit par les dommages de l'ADN tels qu'ils sont provoqués par les radiations ionisantes (*m/s n°11, vol. 11, p. 1617*). Baskaran *et al.* (La Jolla, CA; Baltimore, MD; Cambridge, MA et Bethesda, MD, USA) démontrent dans un récent article de *Nature* que l'activation de la kinase c-Abl induite par l'irradiation est perturbée dans des cellules déficientes en *ATM* mais peut être rétablie en transfectant les cellules avec un vecteur d'expression pour la partie carboxy-terminale d'*ATM*, qui contient le domaine kinase [2]. L'activation de c-Abl par le domaine kinase d'*ATM* exige la phosphorylation de la sérine 465 de c-Abl. Par ailleurs, Shafman *et al.* (Boston, MA; Philadelphie, PA, USA; Queensland, Australie et Tel Aviv, Israël) rapportent qu'il existe une interaction physique entre le domaine SH3 de c-Abl et le motif kinasique d'*ATM* [3]. Ces deux articles suggèrent que l'altération de l'ADN aboutit, par

un mécanisme inconnu, à l'activation en cascade d'*ATM* qui provoque la phosphorylation de c-Abl, stimulant ainsi son activité kinasique. Les étapes situées plus en aval dans la voie de transmission du signal qui aboutit au blocage des cellules en phase G1 du cycle et à la réparation de l'ADN ne sont pas connues. On sait que l'induction de p53 est une autre conséquence des altérations de l'ADN qui conduit au blocage en phase G1 et, dans certains cas, à l'apoptose (*m/s n°1, vol. 9, p. 100*). Cependant, c-Abl ne semble pas être indispensable à cette accumulation de la protéine p53 provoquée par les radiations ionisantes, si bien que p53 et c-Abl pourraient être deux cibles distinctes de la protéine *ATM*.

[1. Aurias A. *Med Sci* 1994; 10: 957-61.]

[2. Baskaran R, *et al.* *Nature* 1997; 387: 516-20.]

[3. Shafman T, *et al.* *Nature* 1997; 387: 520-3.]

■■■■ **Le mythe de Prométhée revisité.** Pour avoir volé le feu sacré des Dieux de l'Olympe, Prométhée fut condamné à un terrible supplice : enchaîné à un roc, il devait en effet voir chaque soir un aigle noir venir lui dévorer un lobe de son foie qui, régénérant sans fin, le condamnait au châtement éternel. Ainsi, il y a des milliers d'années déjà, décrivait-on les premiers résultats « expérimentaux » de régénération hépatique, un processus complexe et finement réglé qui permet aux souris, aux rats ou aux hommes de reconstituer rapidement (5 à 15 jours selon les espèces) *ad integrum* la masse hépatique après une résection de près des deux tiers du foie. Des cytokines et des facteurs de croissance, principalement HGF (*hepatocyte growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), TGF α (*transforming growth factor α*), sont impliqués au cours de la régénération, et font l'objet d'une revue générale dans *Science* [1]. Le TNF α (*tumor necrosis factor α*) et l'IL-6 (interleukine-6) viennent compléter le scénario. On savait qu'après une hépatectomie des deux tiers, on observe une production importante de TNF α par les cellules de Kupffer du foie restant, et qu'en bloquant les effets du TNF α , on inhibe le processus régénératif. En hépatectomisant des souris invalidées pour le gène du récepteur de type I du TNF α , Fausto et son équipe observent un sévère retard à la régénération, accompagné d'une augmentation de la mortalité (50 %, normalement de l'ordre de 10 %), et l'absence d'activation de facteurs de transcription clés comme NF- κ B (*m/s n° 4, vol. 12, p. 541*), API et STAT3 (*m/s n° 2, vol. 10, p. 202*) [2]. La correction du phénotype par l'administration d'IL-6 recombinante, ainsi que l'effet inducteur antérieurement connu du TNF α sur la libération d'IL-6, suggèrent le rôle-clé de cette cytokine [2]. Des résultats similaires ont été obtenus par Taub *et al.* [4] qui ont pratiqué ces mêmes hépatectomies chez des souris déficientes en IL-6 et observé une absence com-

plète de régénération hépatique et une insuffisance hépato-cellulaire rapidement mortelle. Ici encore, le phénotype est entièrement corrigé par l'administration d'IL-6 recombinante [3]. Administrés à des animaux non hépatectomisés, TNF α , IL-6 ou HGF ne sont pas des agents mitogènes. En revanche, au cours de la régénération aiguë qui suit l'hépatectomie des deux tiers, TNF α et IL-6 pourraient déclencher le passage rapide des hépatocytes de la phase G0 à G1 ; l'activation massive du récepteur c-Met de l'HGF entraînerait ultérieurement le passage de G1 en G1/S. Le rôle-clé du TNF α et de l'IL-6 dans l'initiation du processus régénératif devrait maintenant être étudié au cours de la chirurgie hépatique (résections hépatiques étendues, transplantation de foies réduits) ou de l'insuffisance hépatique aiguë, particulièrement dans des perspectives thérapeutiques.

[1. Michalopoulos GK, DeFrances MC. *Science* 1997 ; 276 : 60-6.]

[2. Yamada Y, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 1441-6.]

[3. Cressman DE, *et al. Science* 1996 ; 274 : 1379-83.]

■■■■ **Des souris déficientes en α -galactosidase A : un modèle de la maladie de Fabry.** La maladie de Fabry est une maladie héréditaire liée à l'X, caractérisée par un déficit en α -galactosidase A (α -Gal A) qui conduit à l'accumulation tissulaire de glycosphingolipides conservant un résidu α -galactose terminal, dont le céramide-trihexoside (CTH) [1]. Jusqu'à présent, il n'y avait pas de modèle chez l'animal de la maladie de Fabry. Ohshima *et al.* (NIH, Bethesda, MD, USA et Tokyo, Japon) ont invalidé, par recombinaison homologue, le gène α -Gal A chez la souris (gène très similaire au gène humain correspondant) [2]. La construction utilisée comporte un délétion de 1 kb touchant en partie l'exon III et l'intron III du gène. A l'âge 10-14 semaines, les souris ainsi

obtenues n'ont pas de manifestations anormales, mais elles ont un déficit presque complet de l' α -Gal A dans le foie et les fibroblastes ; des inclusions intralysosomales caractéristiques de la maladie de Fabry sont mises en évidence en microscopie électronique dans les tubes rénaux ; la surcharge est bien due à l'accumulation de résidus α -D-galactose (auxquels se lie spécifiquement une lectine) ; enfin le CTH s'accumule dans le foie et les reins. Les auteurs ont pu transférer les fibroblastes de souris déficientes en α -Gal A en utilisant des rétrovirus portant l'ADNc α -Gal A et l'ADNc MDR1 humains (MDR : *multidrug resistance*), ce dernier utilisé comme marqueur de sélection [3]. Cette transduction entraîne une correction significative du déficit enzymatique et la clairance du matériel accumulé. Ces souris représentent un modèle pour tester la correction *in vivo* de ce déficit ; il reste à savoir à quel rythme les souris déficientes vont développer les conséquences de la surcharge viscérale.

[1. Poenaru L. *Med Sci* 1996 ; 12 : 35-46.]

[2. Ohshima T, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 2540-4.]

[3. Lepage P, Gros P. *Med Sci* 1995 ; 11 : 357-66.]

■■■■ **AAV, thérapie génique des hémoglobinopathies et rôle des éléments d'attachement à la matrice.** Le transfert d'un gène globine fonctionnel dans les cellules-souches hématopoïétiques est depuis longtemps envisagée comme thérapeutique des hémoglobinopathies majeures, thalassémies ou drépanocytose [1]. Les difficultés s'avèrent cependant nombreuses, liées tant à l'inefficacité des vecteurs qu'à l'instabilité génomique des segments intégrés qui, pour être exprimés à un niveau suffisant, doivent inclure les éléments régulateurs du LCR (*locus control region*). Parmi les vecteurs utilisés, les AAV (*adeno-associated virus*) présentent deux types d'inconvénients : un virus AAV

recombinant peut être exprimé de façon épisomique pendant plusieurs jours, ou même semaines, dans une cellule sans y être intégré, et y être donc sans valeur thérapeutique; de plus, l'intégration dans le génome est habituellement repérée par un marqueur tel que la néomycine, qui peut ne pas être sans inconvénient, et qui, par ailleurs, est positive même à un niveau d'intégration insuffisant pour une efficacité thérapeutique. Un travail récent du groupe de Nienhuis (Memphis, TN, USA) semble présenter une avancée dans ce domaine [2]. Le gène transféré est le gène codant pour la γ -globine, dont l'efficacité dans les thalassémies et la drépanocytose a été largement établie. L'utilisation d'un marqueur étranger a été remplacée par l'utilisation d'un gène « marqué » par une microdéletion de 6 pb dans la région promotrice, laquelle permet par *Southern blot* de le différencier du gène endogène. Le travail a été effectué sur lignée érythroleucémique immortalisée K562. Enfin, deux constructions ont été comparées, le fragment intégré comprenant le gène γ -globine et trois des séquences activatrices du LCR, HS2, HS3 et HS4 dans un cas, alors que dans l'autre la séquence HS4 avait été remplacée par la séquence de 750 pb, élément régulateur situé en 3' du gène γ et considérée comme élément de fixation à la matrice nucléaire (MAR). Dans ces conditions, les auteurs ont constaté une expression épisomique pouvant durer jusqu'à sept semaines, suivie, dans des délais variables d'une intégration génomique, décelable par cartographie de restriction. Cette intégration était inconstante, et le niveau d'expression environ la moitié de celui du gène endogène quand la construction ne comportait que le gène γ -globine et les éléments du LCR. Par l'addition d'une MAR, en revanche, on obtenait une intégration dans tous les clones et un niveau d'expression en moyenne six fois supérieur ($\times 3$ à 14) à celui du gène endogène. Cette intégration se fait en concatamère, tête à

queue, et nécessite une multiplicité d'infection supérieure à ce qu'on emploie habituellement ($> 5 \times 10^7$). On peut penser que cette multiplicité d'infection requise serait nécessaire dans des cellules quiescentes qui ont peu de récepteurs, et qu'elle faciliterait la conversion du AAV en double brin et son intégration ultérieure. Ces résultats, obtenus en lignées cellulaires, demandent à être vérifiés sur modèle animal, mais ouvriraient peut-être une perspective pour une transduction *ex vivo* des cellules souches de la moelle.

- [1. Kahn A. *Med Sci* 1988 ; 4 : 252-4.]
 [2. Hargrove PW, *et al. Blood* 1997 ; 89 : 2167-75.]

■■■ **Coqueluche : un vaccin recombinant, construit de façon rationnelle.** Une protection maximale et une toxicité réduite au minimum sont évidemment le but de toute vaccination. Les produits vaccinaux employés jusqu'à présent contre le *Bordetella pertussis*, le germe de la coqueluche, étaient des dérivés de sa toxine (PT) détoxifiée par traitement chimique. Ce procédé, largement employé pour d'autres vaccinations, diphtérie ou tétanos, pourrait avoir un double inconvénient : il est potentiellement toxique, il modifie aussi la conformation de l'antigène. L'originalité du vaccin proposé par le laboratoire «Chiron vaccines» (Sienne, Italie) est la modification de la toxine par deux mutations ponctuelles, qui rendent le site catalytique inactif [1]. Le vaccin, dont les épitopes ont gardé leur conformation d'origine, peut donc être utilisé sans inactivation ultérieure, et à de faibles doses d'antigène. Les premiers essais cliniques en phase I démontrent son immunogénicité et son efficacité, avec une réponse nettement plus forte et plus rapide que les vaccins traditionnels.

- [1. Rappuoli R. *Nature Med* 1997 ; 3 : 374-5.]

■■■ **Insecte, parasite pathogène, bactérie symbiotique : un ménage à trois dont on pourrait tirer profit !**

Certaines maladies sont transmises aux plantes, aux animaux ou aux hommes par des insectes qui véhiculent des micro-organismes pathogènes. Question : tout en préservant l'insecte vecteur, important pour l'écosystème, comment inactiver spécifiquement l'agent pathogène ? Réponse : utiliser une bactérie symbiotique de l'insecte et, par transgène, rendre cette bactérie destructrice de l'agent pathogène. Le comportement coprophage de l'insecte permet alors une dissémination de la bactérie transgénique. Telle est la stratégie envisagée aujourd'hui pour prévenir une maladie fréquente en Amérique du Sud et centrale, la maladie de Chagas [1]. Celle-ci est causée par un parasite, le trypanosome *Trypanosoma cruzi* véhiculé par l'insecte *Rhodnius prolixus*. La bactérie *Rhodococcus rhodnii*, qui colonise l'intestin de l'insecte, a été rendue « parasiticide » par l'introduction d'un gène codant pour une substance toxique pour le trypanosome, un peptide amidé de 37 acides aminés appelé cecropin A. Alors que dans ce modèle, l'insecte et la bactérie sont insensibles à la cecropin A, le peptide est fortement toxique pour le trypanosome *T. cruzi*. Lorsque la bactérie *R. rhodnii* contient le transgène *cecropin*, les premiers résultats montrent que la cecropin A est retrouvée spécifiquement dans l'intestin des insectes portant la bactérie génétiquement transformée. Des préparations d'intestins d'insectes colonisés par des bactéries recombinantes ont un effet lytique sur le trypanosome *T. cruzi*. Dans une étude *in vivo* portant sur des insectes parasités par le trypanosome, l'effet antiparasitaire du transgène peut être total (70 % des cas) ou partiel (réduction de 10 à 100 fois de la concentration parasitaire intestinale). Enfin, une dispersion efficace de la bactérie transgénique dans la population des insectes a pu être réalisée à l'aide de

■■■ BRÈVES ■■■

préparations artificielles de fèces imprégnées de bactéries recombinantes. L'ensemble de ces résultats démontre clairement la faisabilité d'une démarche tout à fait originale pour limiter voire prévenir de nombreuses maladies touchant aussi bien les végétaux que des populations humaines ou animales.

[1. Durvasula RV, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3274-8.]



L'Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose lance un Appel d'Offres à 2 volets pour 1997

1. APPEL D'OFFRES « PROGRAMMES »
Regroupement, autour d'une hypothèse de travail, de plusieurs équipes complémentaires françaises ou étrangères qui travailleront de manière coordonnée pendant plusieurs années à sa réalisation.

Ces programmes doivent concerner l'une des thématiques suivantes :

- Thérapie génique pour la mucoviscidose,
- Physiopathologie de CFTR et stratégies de restauration,
- Infection/Inflammation : prévention de la destruction pulmonaire.

2. APPEL D'OFFRES « PROJETS »

Des projets innovants concernant toutes les thématiques de recherche sur la mucoviscidose, pour des équipes isolées ou en réseau, peuvent être proposés. Pour ces 2 volets de l'appel d'offres :

- l'objectif principal doit être la recherche d'un traitement de la mucoviscidose,
- les demandes de bourses doctorales ou postdoctorales doivent être intégrées à ces programmes, projets ou réseaux,
- les renseignements et formulaires sont à demander à :

AFLM, 76, rue Bobillot, 75013 Paris
Fax : 01 45 80 86 44 ou - E-mail : aflm@casynet.fr

Date limite de dépôt des dossiers : 30 septembre 1997

SOCIÉTÉ DE BIOLOGIE

Collège de France, Paris, France

Journée Claude-Bernard 19 novembre 1997

Amphithéâtre de Stomatologie
Hôpital Pitié-Salpêtrière,
50/52, boulevard Vincent-Auriol,
75013 Paris, France

INVASION MÉTASTATIQUE TUMORALE

8 h 30 Accueil des participants - Introduction de Jacques PICARD

8 h 45 Claude GRISCELLI (Directeur général de l'Inserm)
Introduction

9 h 00 Dominique STEHEUN (Cnrs, Institut Pasteur - Lille)
Similitudes entre les mécanismes de néoangiogenèse et d'invasion tumorales

9 h 30 Jean-Paul THIERY (Cnrs, Institut Curie - Paris)
Rôle des facteurs de croissance dans la dissémination métastatique

10 h 00 Jean-Marie BLANCHARD (Cnrs, IGM - Montpellier)
Contrôle du cycle cellulaire et progression tumorale

10 h 30 *Pause-café*

11 h 00 Marc MAREEL (Hôpital Université - Gand)
E-cadhérine et α -caténine dans l'invasion cancéreuse

11 h 30 Daniel LOUVARD (Cnrs, Institut Curie - Paris)
Rôle de l'ezrine dans la motilité des cellules épithéliales normales et tumorales

12 h 00 Jean FEUNTEUN (Cnrs, Institut Gustave-Roussy - Villejuif)
Prédisposition génétique au cancer du sein et de l'ovaire

12 h 30 *Déjeuner*

14 h 30 Henri ROCHEFORT (Inserm, Montpellier)
Influence des œstrogènes et de la cathepsine D dans l'invasion métastatique des cancers du sein

15 h 00 Paul BASSET (Cnrs, IGBMC - Strasbourg)
Les protéases extracellulaires d'origine stromale : contribution à la progression cancéreuse et perspectives thérapeutiques

15 h 30 Marie-France POUPON (Cnrs, Institut Curie - Paris)
Effet de mutations de la protéine p53 sur la stabilité génomique et le potentiel métastatique dans une lignée humaine de cancer du côlon

16 h 00 *Pause-café*

16 h 15 Jean BÉNARD (Institut Gustave-Roussy - Paris)
Les facteurs oncogéniques de la dissémination métastatique du neuroblastome

16 h 35 Hugues de THÉ (Cnrs, Institut Hôpital Saint-Louis - Paris)
La leucémie promyélocytaire, un modèle thérapeutique ciblé sur l'oncogène

17 h 00 Patricia PATERLINI (Inserm - Paris)
Implications cliniques de la dissémination spontanée et iatrogène de cellules tumorales chez les patients avec cancer primitif du foie

17 h 30 *Table ronde*

**Inscription
pour les communications
et le lunch :**

**Avant le 15-10-97
auprès du Secrétariat
de la Société de Biologie,
Collège de France,
3, rue d'Ulm - 75231 Paris Cedex
05, France
Tél. : 01 44 27 13 40**

BIBLIOTHÈQUE

LES GROUPES SANGUINS

L'écriture des gènes

C. Salmon

Les groupes sanguins ne sont généralement connus du public que par leur aspect immunologique et leur application principale, la transfusion. Cet ouvrage prend le parti de présenter les groupes sanguins à partir des disciplines scientifiques qui en permettent l'approche, mettant l'accent sur la génétique et incluant les groupes sanguins dans les "empreintes génétiques" dont ils font partie. L'auteur explique comment les groupes sanguins relèvent aussi de la biochimie, de la biologie moléculaire moderne et de l'embryologie. Il décrit les applications des groupes sanguins en immunologie (transfusion, grossesses, greffes d'organes), en pathologie (autoimmunité) et en génétique aussi bien celle des individus (identité et paternité) que celle des populations humaines.



Éd. Masson,
1997, 208 pages, 250 F