

■■■■ **Des vecteurs cellulaires de thérapie génique naturellement ciblés.**

Une stratégie de transfert de gène à visée thérapeutique ne peut s'arrêter à la définition du « gène thérapeutique » approprié et à la mise au point d'une méthode pour l'administrer au patient. Outre l'indispensable prise en compte de la persistance de l'expression et de la tolérance de l'organisme pour le traitement, le « ciblage » est un problème incontournable. A quoi sert un magnifique vecteur viral recombinant pour la dystrophine, par exemple, si le seul moyen que l'on propose pour « cibler » son introduction dans les muscles des patients myopathes est l'injection à la seringue... à l'évidence totalement inapplicable. De même, à quoi bon envisager d'apporter des facteurs neuroprotecteurs aux motoneurons chez des patients atteints de sclérose latérale amyotrophique si l'on doit, pour cela, imprégner chaque muscle du corps d'une quantité énorme de vecteurs viraux potentiellement toxiques. Un certain nombre d'équipes tentent, depuis quelques années, de s'attaquer précisément à ce problème de ciblage sur la base d'une idée aussi simple que stimulante, utiliser comme vecteur cellulaire de thérapie génique des cellules de l'organisme qui sont naturellement ciblées vers les zones affectées [1, 2]. En dehors des cellules monocytaires/macrophagiques, c'est bien sûr les lymphocytes T qu'évoque cette définition et c'est effectivement grâce à eux que l'équipe de Vincent Tuohy (Cleveland, OH, USA) vient d'obtenir des résultats très intéressants dans un modèle expérimental de sclérose en plaques chez la souris (encéphalite allergique expérimentale, EAE) (*m/s n° 7, vol. 11, p. 1051*) [3]. Comme son pendant humain, l'EAE provoque une atteinte multifocale « en plaques » des gaines de myéline d'axones circulant dans le système nerveux central. Dans le modèle, cette atteinte dépend d'une activité auto-immune de lym-

phocytes T CD4⁺ de phénotype Th1, qui produisent notamment de l'IL2. Des études récentes ont montré que des lymphocytes Th2, qui produisent notamment de l'IL-10, bloquent l'évolution de la maladie. Les auteurs ont eu l'idée d'utiliser les lymphocytes Th1 eux-mêmes, spécifiquement activés par la protéine protéolipide de la myéline (PLP), pour en faire par transfert de gène *ex vivo* avant réinjection, des vecteurs cellulaires d'*IL-10* ciblés sur les zones de lésion. Le gène codant pour cette cytokine anti-inflammatoire étant placé sous le contrôle du promoteur de l'*IL-2*, ces lymphocytes Th1 modifiés sont naturellement passés du statut d'incendiaires à celui de pompiers, sans changer en quoi que ce soit ni le lieu, ni le moment de leur intervention. Les auteurs rapportent que l'administration de ces vecteurs *IL-10* à des souris SWXJ immunisées par PLP a empêché le déclenchement de l'EAE, ou diminué nettement des effets déjà installés. Ce résultat, très intéressant dans une perspective de traitement de la sclérose en plaques, est sans doute aussi une ouverture pour de nombreuses applications du transfert de gène au traitement de maladies multifocales ou diffuses possédant une composante immune ou inflammatoire.

[1. Kramer R, *et al. Nat Med* 1995; 1: 1162-6.]
 [2. Parrish E, *et al. Gene Ther* 1996; 3: 13-20.]
 [3. Mathisen PM, *et al. J Exp Med* 1997; 186: 159-64.]

■■■ **La salmonelle trafiquée au service de la thérapie anticancéreuse !**

Au risque de surprendre, la bactérie *Salmonella* pourrait être utilisée en thérapie anticancéreuse, non pas uniquement en vertu de ses capacités antitumorales propres, mais aussi comme vecteur d'agent thérapeutique destiné spécifique-

ment aux tumeurs solides. C'est ce que suggère une équipe américaine (New Haven, CN) après avoir élaboré différentes souches de bactéries susceptibles de remplir cette mission [1]. Pourtant, les conditions requises pour ces bactéries étaient sévères: (1) une croissance en conditions aérobiques et anaérobiques, adaptée à l'environnement des tumeurs solides; (2) un ciblage sélectif à la tumeur avec accroissement de la capacité invasive; (3) une atténuation de la virulence; (4) la capacité d'exprimer un transgène « thérapeutique ». Plusieurs souches bactériennes répondant à ces critères ont ainsi été produites par mutagenèse; elles ont été sélectionnées sur la base de mutations polyauxotrophes* affectant en particulier la biosynthèse des purines, de l'uracyl, d'acides aminés aromatiques et non aromatiques, l'idée étant que seul l'environnement de la tumeur riche en nutriments essentiels est capable de subvenir aux besoins métaboliques de ces bactéries. Les chiffres parlent d'eux-mêmes: chez la souris porteuse de mélanomes transplantés, l'inoculation intrapéritonéale de souches polyauxotrophes dont la virulence a été fortement atténuée peut conduire en 4 jours à une accumulation des bactéries 9 000 fois plus importante dans la tumeur que dans le foie par exemple, la concentration bactérienne étant, par ailleurs, devenue largement supérieure à celle de l'inoculum d'origine. Conséquence souhaitée de toutes ces manipulations, les bactéries mutantes sélectionnées retardent considérablement la croissance des tumeurs transplantées chez la souris. Fortes de leur capacité de cibler spécifiquement la tumeur, ces bactéries pouvaient servir de vecteurs pour introduire des agents thérapeutiques dans une tumeur solide à distance. Dans cette perspective, les

* Rendant la bactérie dépendante pour sa croissance de la présence dans le milieu de plusieurs facteurs ou métabolites.

bactéries sélectionnées ont été transfectées avec le gène de la thymidine kinase (TK), l'enzyme produite dans la tumeur devant phosphoryler le ganciclovir, et ainsi activer cet agent anticancéreux (*m/s n° 7, vol. 8, p. 728*). Là encore, les chiffres prédisposent à l'optimisme: des souris avec un mélanome implanté, inoculés 8 jours plus tard avec la souche TK montrent une réduction de 2,5 fois de la taille de la tumeur après 1 mois de traitement périodique au ganciclovir, une amélioration qui retentit directement sur la survie des animaux. La bactérie *Salmonella* a ainsi prouvé sa capacité de délivrer des protéines thérapeutiques à des cellules cancéreuses *in vivo*. Une thérapie anticancéreuse efficace ciblant des métastases à distance ou des tumeurs primaires ne justifierait-elle pas d'exploiter un tel outil si l'innocuité du vecteur utilisé était confirmée? Cependant, il faudrait bien des garanties préliminaires pour que l'on se hasarde à créer une septicémie chez des malades cancéreux dans l'espoir que l'infection serait exclusivement nocive pour le tissu tumoral!

[1. Pawelek JM, *et al. Cancer Res* 1997; 57: 4537-44.]

■■■■ **Syndrome de Bartter de type III.** Le syndrome de Bartter est caractérisé par une hypokaliémie et une alcalose métabolique, dues à un défaut de réabsorption tubulaire rénale de NaCl dans la branche ascendante large de l'anse de Henle (*thick ascending limb*, TAL). Ce syndrome se transmet selon le mode autosomique récessif. Deux anomalies moléculaires ont déjà été identifiées, touchant respectivement le co-transporteur Na-K-2Cl (type I) et le canal potassique ROMK (type II) (*m/s n° 1, vol. 13, p. 61; n° 8-9, vol. 12, p. 1022*). Le même groupe de Yale University

(CN, USA), en collaboration avec de multiples centres de pédiatrie, vient d'ajouter un troisième défaut moléculaire, concernant le canal chlorure CLCNKB dont le gène, localisé au chromosome 1, a été trouvé muté et inactivé dans 17 familles atteintes de syndrome de Bartter [1]. La seule particularité de ces dernières familles est l'absence de néphrocalcinose, même lorsque la calciurie est élevée, alors que cette complication est fréquente dans les variétés I et II. Par ailleurs, la gravité de la maladie est très variable d'une famille à l'autre, se révélant souvent à la naissance ou dans les premiers mois de vie mais, dans un cas, à l'âge de 16 ans. Chez l'homme, deux canaux chlorure appartenant à la famille CLC, formés vraisemblablement de 12 segments transmembranaires, sont spécifiquement exprimés dans le rein; ils sont codés par les gènes *CLCNKA* et *CLCNKB* [2]. Les 10 exons de ces deux gènes ont 94 % d'identité de séquence d'ADN. Ils sont contigus, séparés par 11 kb d'ADN génomique. Les mutations de *CLCNKB* sont des délétions dans 10 cas sur 17, incluant une délétion due à une recombinaison inégale entre *CLCNKA* et *CLCNKB* (il en résulte la perte homozygote des exons 1 et 2 de *CLCNKB* et des exons 3 à 19 de *CLCNKA*). Les 7 autres mutations sont faux-sens ou non-sens; deux sujets atteints sont hétérozygotes composites. La fréquence des délétions homozygotes suggère une perte de fonction du canal (localisé à la membrane basolatérale des TAL), empêchant ainsi le transit du chlorure, réabsorbé à la face apicale, à travers la membrane basolatérale vers le courant sanguin. Il n'y a donc probablement pas d'autre voie disponible de sortie du chlorure capable de compenser le déficit. Le gène *CLCNKA* qui n'est pas muté dans la plupart des cas, ne permet pas cette compensation. Comme le rappelle R.V. Thakker [3], une autre maladie rénale, la maladie de Dent (*m/s n° 4,*

vol. 12, p. 542), est due à une anomalie d'un autre canal chlorure, CLC5.

[1. Simon DB, *et al. Nat Genet* 1997; 17: 171-8.]

[2. Kieferle S, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6943-7.]

[3. Thakker RV. *Nat Genet* 1997; 17: 125-7.]

■■■■ **Fas et Myc, ou comment relier oncogénèse et apoptose.** Depuis les premières descriptions du système Fas/APO-1/CD95 à la fin des années 1980 (*m/s n° 7, vol. 8, p. 735*) et le clonage du récepteur et de son ligand (*m/s n° 2, vol. 10, p. 234*) (Fas et Fas L), ce dernier ne cesse d'occuper le devant de la scène de l'apoptose [1]. On a déjà relaté dans *m/s* son rôle déterminant dans le fonctionnement de la réaction immunitaire, tant pour induire la mort de cellules cibles que pour éliminer les clones lymphocytaires activés une fois leur tâche accomplie (*activation induced cell death*). Plus récemment, il a été impliqué dans la pathogénie des hépatites (*m/s n° 1, vol. 12, p. 84*), du diabète, des thyroïdites (*m/s n° 4, vol. 13, p. 612*), ou du SIDA [2]. Dans le domaine de la carcinologie, il a également suscité une attention particulière, en particulier au cours de la progression tumorale des mélanomes, des astrocytomes, des cancers coliques et des hépatocarcinomes [3, 4]. Ainsi, une diminution de l'expression du récepteur Fas dans ces tumeurs explique partiellement la résistance à l'apoptose induite par les cellules immunocompétentes censées détruire les cellules transformées. Mieux, l'expression *de novo* du ligand de Fas sur ces tumeurs rend compte d'une tolérance immunitaire, expliquée par la destruction des cellules immunocompétentes exprimant Fas par les cellules tumorales devenues « cytotoxiques ». Enfin, l'apoptose induite par l'onco-

gène *c-Myc* serait relayée par la voie de Fas comme le démontrent les équipes de G. Evan (Londres, GB) et de S. Nagata (Osaka, Japon) dans *Science* [5]. Travaillant sur des lignées cellulaires devenant apoptotiques après qu'elles ont exprimé *c-Myc* de manière conditionnelle, les auteurs observent une inhibition de cette apoptose secondaire à l'action neutralisante d'anticorps (anti-FasL) ou de molécules chimériques (Fas-Fc) bloquant l'interaction de FasL avec Fas. Cette inhibition de l'apoptose est également observée dans des cellules exprimant un mutant dominant négatif de FADD, une molécule indispensable à la transmission du signal Fas, et, dans des cellules du fond *Lpr* et *Gld* qui portent des mutations abolissant respectivement le caractère fonctionnel de Fas et de FasL. De plus, Bcl-2 ou IGF-I, reconnus pour bloquer l'apoptose dépendante de Fas dans de nombreux types cellulaires, inhibent l'apoptose induite par Myc. Les liens entre les deux voies apoptotiques (Myc et Fas) restent cependant hypothétiques [6]. La protéine *c-Myc* pourrait induire l'expression de Fas et de FasL, en partie *via* p53. Elle pourrait également participer à une sensibilisation de la cellule à la voie de Fas. En effet, il apparaît que la seule interaction de FasL avec Fas n'est pas suffisante pour induire la mort cellulaire. Elle nécessite l'intégrité de la voie de transmission du signal, et celle-ci apparaît modulable par *c-Myc* à différents niveaux. Ainsi, aux premiers stades de la transformation, la cellule reste sensible à une apoptose globalement « bénéfique », susceptible de contrôler l'émergence de clones tumoraux. Plus tard, l'acquisition d'une résistance à l'apoptose relayée par Fas (expression de gènes anti-apoptotiques tels *Bcl-2*, régulation négative de l'expression du récepteur Fas ...) pourrait participer à la progression tumorale. Des dysfonctions du système Fas, que G. Evan n'hésite pas à considérer comme suppresseur de tumeurs, pourraient ainsi s'avérer

impliquées dans de très nombreux processus néoplasiques.

- [1. Nagata S. *Cell* 1997; 88: 355-65.]
- [2. French LE, Tschopp J. *Nat Med* 1997; 3: 387-8.]
- [3. Nagata S. *Nat Med* 1996; 2: 1306-7.]
- [4. Strand S, et al. *Nat Med* 1996; 2: 1361-6.]
- [5. Hueber MO, et al. *Science* 1997; 278: 1305-9.]
- [6. Green DR. *Science* 1997; 278: 1246-7.]

■■■■ **Douleur: la couche I en première ligne.** Les influx nerveux induits par des stimulations nociceptives, cutanées, musculaires ou viscérales, parviennent à la corne dorsale de la moelle épinière par l'intermédiaire de fibres fines, soit faiblement myélinisées (fibres A δ), soit totalement amyéliniques (fibres C) (*m/s n° 5, vol. 12, p. 705*). Les neurones spinaux qui relayent ces informations vers les centres du tronc cérébral et de l'encéphale sont, principalement, localisés dans la couche cellulaire la plus superficielle (couche I) et dans deux régions plus profondes, la couche V (*nucleus proprius*) et la couche VII. Des études anatomiques et électrophysiologiques très nombreuses ont permis d'identifier les neurones de la couche I et de la couche V comme les meilleurs candidats pour une transmission d'informations précises, « sensori-discriminatives », sur la localisation, la durée, et l'intensité des stimulations. Le rôle respectif de ces deux groupes neuronaux morphologiquement et fonctionnellement très différents n'était toutefois pas précisé. L'équipe de Pat Mantyh (Minneapolis, MI, USA) vient de faire progresser considérablement cette question grâce à une expérience d'ablation cellulaire sélective très élégante. Les fibres afférentes de type C (amyéliniques) contiennent souvent de la substance P, un neuropeptide qu'elles libèrent au niveau de leurs terminaisons et qui agit sur des récepteurs spéci-

fiques portés par les cellules spinales cibles. Pat Mantyh et son équipe avaient démontré, il y a deux ans, que la substance P liée à son récepteur était internalisée [1]. Cela leur a donné l'idée d'utiliser la substance P comme cheval de Troie pour faire pénétrer spécifiquement dans les neurones spinaux porteurs du récepteur une molécule tueuse, la saporine [2]. En administrant le complexe substance P/saporine dans le liquide céphalo-rachidien, ils ont obtenu une ablation sélective des neurones de la couche I, le gradient de diffusion du complexe dans le parenchyme, très abrupt, ne lui permettant pas de toucher des neurones des couches plus profondes. Les animaux ainsi lésés ont présenté des troubles de la sensibilité à la stimulation nociceptive tout à fait singuliers : leur seuil de réponse à une stimulation thermonociceptive est resté inchangé alors que leur réponse à une stimulation nociceptive de très forte intensité était très largement diminuée. Ainsi, les neurones de la couche I paraissent indispensables à la distinction entre stimulations nociceptives de faible et de forte intensité, alors qu'ils ne sont pas indispensables à la détection même du caractère nociceptif d'un stimulus. Ces mêmes neurones jouent, par ailleurs, un rôle essentiel dans l'hyperalgésie. Ces données ouvrent des perspectives extrêmement intéressantes quant au traitement de la douleur en incriminant une population de neurones très précise dans la transmission des influx responsables de la gêne la plus grande des patients. Peut-on aller au-delà et suggérer que l'ablation neuronale sélective, d'outil expérimental à visée cognitive, pourrait devenir une nouvelle voie thérapeutique pour les douleurs chroniques? Les auteurs sont trop sérieux et prudents pour le faire et se contentent d'indiquer que si l'on voulait l'envisager, un long chemin resterait à parcourir.

- [1. Mantyh PW, et al. *Science* 1995; 268: 1629-33.]
- [2. Mantyh PW, et al. *Science* 1997; 278: 275-9.]