

Maladies génétiques et thérapie génique

Chaque livraison de médecines/sciences comporte son lot de maladies génétiques dont les bases moléculaires sont élucidées, qu'il s'agisse de la découverte du gène responsable ou de la compréhension de leur physiopathologie. Ainsi, on avait identifié il y a quelques années le gène responsable d'une anomalie de la myélinisation du système nerveux central chez l'homme et la souris, dont il existait des formes sévères, rapidement létales, et d'autres d'évolution moins dramatique. Le gène en cause dirige la synthèse de deux protéines de la myéline, la protéine protéolipide PLP et une isoforme tronquée DM20 engendrée par épissage alternatif. C'est l'atteinte de cette dernière qui règle la gravité de la maladie, car elle semble indispensable au transport cellulaire de la PLP qui, sans DM20, s'accumule dans le réticulum endoplasmique et entraîne la mort des oligodendrocytes. Cette observation n'a pas encore d'évidentes implications thérapeutiques et la thérapie génique de la maladie de Pelizaeus-Merzbacher n'est probablement pas pour bientôt. Pourtant, le champ de la thérapie génique, malgré les difficultés rencontrées, n'est pas endormi. « L'oligonucléotide magique », capable de « réparer » des gènes par recombinaison homologue, a pu corriger la mutation drépanocytaire de cellules en culture et de nouvelles méthodes sont proposées pour conférer à des cellules modifiées un avantage sélectif in vivo. Enfin, hors du domaine des maladies génétiques, la compréhension et la modulation de « l'effet bystander » en thérapie génique du cancer progresse. Les jonctions communicantes jouent un rôle central dans cet effet dont l'efficacité peut être accrue en accroissant leur nombre.

La possibilité d'une thérapie génique antitumorale amplifiée par l'induction de la communication jonctionnelle intercellulaire

Les traitements anticancéreux classiques, radiothérapie et chimiothérapie, ont beaucoup progressé et permettent aujourd'hui le traitement de cancers qui étaient incurables voici quelques années. Malgré leurs succès, ce sont encore des traitements lourds et contraignants qui s'accompagnent de nombreux effets secondaires. Si effectivement, dans bien des cas, il y a résorption totale ou partielle des tumeurs soignées, l'organisme entier souffre du traitement et parfois n'en sort pas indemne. Il a même été montré que des chimiothérapies toxiques pour l'ADN peuvent être à l'origine de cancers secondaires. En particulier, des relations de cause à effet ont pu être établies entre des traitements anticancéreux utilisant des agents alkylants et l'émergence de leucémies [1]. Une thérapie mieux ciblée qui n'affecterait pas les tissus non tumoraux représenterait un progrès souhaitable. Les avancées récentes de la biologie moléculaire laissent penser que ce ciblage est envisageable et pourrait être appliqué aux traitements antitumoraux par l'utilisation de la thérapie génique [2, 3]. Cette thérapie consisterait à introduire un gène tueur (ou gène suicide) dans les cellules de la tumeur afin de les détruire. Nous savons que les cellules tumorales diffèrent surtout des cellules normales qui les environnent par leurs taux de prolifération et de synthèse d'ADN. Depuis longtemps, des substances cytotoxiques sont connues pour s'incorporer dans l'ADN et en interrompre la synthèse.

Le ganciclovir, un nucléoside, est une de ces substances qui, une fois phosphorylée par une enzyme virale, la thymidine kinase de l'Herpès, s'incorpore dans l'ADN en voie de synthèse. Le ganciclovir phosphorylé entraîne la mort cellulaire en inhibant l'élongation des brins d'ADN (*m/s n° 7, vol. 8, p. 728*). Cette stratégie, combinant l'introduction dans des cellules tumorales d'un gène étranger (celui de la thymidine kinase de l'Herpès) et d'un traitement au ganciclovir, a été appliquée expérimentalement dans le cas de gliomes de rat (*m/s n° 7, vol. 8, p. 728*). La difficulté était de faire exprimer par les cellules tumorales le gène codant pour la thymidine kinase de l'Herpès. Cela fut possible en injectant dans les tumeurs des cellules produisant des rétrovirus défectueux pour la réplication et contenant ce gène. Par le phénomène de la transduction, les cellules tumorales infectées deviennent porteuses du gène de la thymidine kinase qu'elles expriment de façon constitutive. Des injections successives et intrapéritonéales de ganciclovir entraînent ensuite la résorption des tumeurs ainsi traitées [4]. Il est vite apparu que la résorption des tumeurs n'était pas la conséquence d'un taux d'infection virale élevé des cellules tumorales. Des études ont en effet montré que la résorption des tumeurs induites est obtenue même si un nombre relativement faible (10 %) de cellules expriment le gène de la thymidine kinase. Les cellules tumorales infectées semblent donc être

capables de propager leur toxicité aux cellules tumorales voisines. Ce phénomène de « toxicité de proximité » a été décrit sous le terme anglais de *bystander effect* [5].

L'effet *bystander* est d'un intérêt tout particulier en thérapeutique car il permet d'obtenir une résorption quasi complète des tumeurs sans nécessiter l'expression du gène « tueur » dans toutes les cellules tumorales. Différentes hypothèses ont tenté d'expliquer ce phénomène afin de l'utiliser au mieux. Une des hypothèses les plus couramment formulées est celle de la coopération métabolique (*figure 1*). En effet, la plupart des cellules de notre organisme sont capables d'échanger entre elles de petites molécules cytoplasmiques (sucres, acides aminés, ions, nucléotides) par l'intermédiaire des jonctions communicantes (*gap junctions*) qui sont constituées de canaux intercytoplasmiques établis entre cellules adjacentes [6]. Le ganciclovir phosphorylé a la taille requise (< 1 000 Da) pour passer au travers des jonctions communicantes et diffuser sa toxicité aux cellules adjacentes. Certaines hypothèses émises [7, 8] ainsi que des données préliminaires indiquaient cette possibilité [9, 10]. Dès

1988, l'utilisation des jonctions communicantes pour éliminer les cellules cancéreuses avait été proposée par le responsable de notre Unité (Dr H. Yamasaki). De fait, il avait alors montré qu'une substance fluorescente (jaune de Lucifer) micro-injectée dans des cellules malignes en culture se propageait dans celles-ci par les jonctions communicantes et les éliminait après exposition à une lumière bleue d'excitation [11]. Seules les cellules contenant le colorant fluorescent (cellules malignes) étaient tuées par l'activation du produit car sa diffusion ne se réalisait qu'entre les cellules malignes et ne débordait pas dans les cellules normales adjacentes par le fait d'une absence de jonctions communicantes entre les deux types cellulaires [12]. Récemment, nous avons tenté d'estimer *in vitro* le rôle des jonctions communicantes dans l'effet *bystander*. Pour cela, nous avons utilisé des cellules fortement tumorigènes et dépourvues de jonctions communicantes telles que les cellules HeLa. Nous avons incorporé le gène de la thymidine kinase de l'Herpès (gracieusement obtenu du Pr G. Tiraby, Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Appliquée, Université P.-Sabatier, Toulouse) dans ces cel-

lules HeLa qui l'ont exprimé de façon suffisante pour être sensibles au ganciclovir. En mélangeant différentes proportions de cellules HeLa exprimant la thymidine kinase herpétique avec des cellules HeLa ne l'exprimant pas nous avons observé que si le traitement au ganciclovir éliminait les cellules HeLa porteuses du gène de la thymidine kinase, il n'éliminait pas les autres cellules qui continuaient à se propager. En mélangeant jusqu'à 50 % de cellules porteuses du gène, on obtenait une culture totalement confluite après deux semaines de traitement [13].

Nous avons répété l'expérience en utilisant des cellules HeLa rendues communicantes par l'incorporation d'un gène de connexine (les connexines sont les protéines constitutrices des jonctions communicantes [6]). Ces cellules ont été obtenues grâce au Pr K. Willecke (Institut de Génétique, Université de Bonn, Allemagne) [14]. Cette fois-ci, on observait une élimination quasi complète des cellules même si seulement 10 % des cellules HeLa communicantes exprimant le gène de la thymidine kinase de l'Herpès étaient effectivement présentes dans la culture cellulaire. Cela signifiait que 90 % des cellules normalement insensibles au ganciclovir l'étaient devenues par l'établissement des jonctions communicantes et donc d'une communication intercellulaire directe [13]. Ce pourcentage correspond aux observations réalisées *in vivo* [5]. En revanche, la propagation de la toxicité n'était pas observée si les deux types cellulaires (exprimant ou non la thymidine kinase de l'Herpès) n'étaient plus en contact, ni si la culture était traitée avec un inhibiteur fonctionnel des jonctions communicantes, l'acide α -glycyrrhénétique. Ces expériences ne démontrent certainement pas que la présence de jonctions communicantes soit la seule cause de l'effet *bystander* observé *in vivo* même si d'autres expériences réalisées *in vitro* vont dans le même sens que nos observations [9, 10, 15]. En particulier, des phénomènes mentionnés dans la littérature tels que l'endocytose de débris cellulaires toxiques (vésicules apoptotiques) [16], la sécrétion de toxines solubles, des réponses immunitaires indéfinies [17] ou la destruction de vaisseaux irriguant les tumeurs [18] sont autant d'autres causes (encore

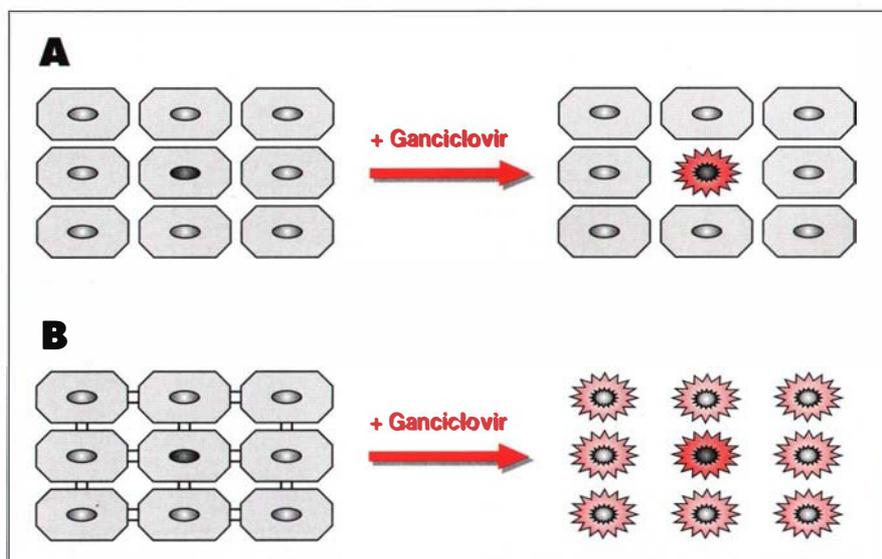


Figure 1. Rôle probable de la communication jonctionnelle intercellulaire (coopération métabolique) dans l'effet bystander. A. Sans connexion entre les cellules, seule la cellule exprimant le gène de la thymidine kinase (noyau noir) serait éliminée par le traitement au ganciclovir. B. La communication jonctionnelle entre les cellules peut expliquer l'effet bystander dû au ganciclovir en permettant la diffusion de la toxicité depuis la cellule qui exprime le gène HSV-tk (noyau noir) aux cellules environnantes qui ne l'expriment pas (noyaux clairs).

non prouvées) pouvant aussi jouer un rôle (en synergie ou non avec les jonctions communicantes) dans l'effet *bystander* observé *in vivo*.

En fait, nos résultats montrent surtout que l'établissement de la communication jonctionnelle intercellulaire serait une condition importante, voire nécessaire, à l'obtention d'un effet *bystander* particulièrement efficace. La limitation de toute thérapie génique est qu'elle ne peut évidemment «toucher» toutes les cellules d'une tumeur: la communication jonctionnelle en serait ainsi un «amplificateur». Malheureusement, notre expérience acquise dans la connaissance des connexines et de leur régulation lors du processus de la cancérogenèse a montré que la communication jonctionnelle des cellules tumorales (ou tumorigènes) est souvent altérée [19].

Cette altération, quelle que soit l'origine des cellules (fibroblastes, épithéliales, *in vitro*, *in vivo*, animales, humaines) est une caractéristique du phénotype malin. Elle semble être le résultat de processus divers puisque l'absence de la communication par jonctions communicantes provient, soit d'une inhibition de la transcription des gènes de connexines, soit d'un défaut de localisation des connexines [20].

Le rétablissement de la communication jonctionnelle intercellulaire dans les tumeurs à traiter par la thérapie *HSV-tk/ganciclovir* serait donc garant d'un effet *bystander* amplifié. Or, certaines substances (caroténoïdes, AMP cyclique, etc.) sont connues pour induire ce genre de communication intercellulaire. Par exemple, les rétinolides induisent la transcription de la connexine 43 dans des fibroblastes de souris transformés chimiquement [21]. Dans d'autres types cellulaires, il a été montré que la fonction de cette connexine est souvent augmentée par des traitements à l'AMP cyclique [22]. La phosphorylation de la portion carboxy-terminale et intracytoplasmique de la connexine 43 par la stimulation de kinases dépendantes de l'AMP cyclique pourrait être la cause (par changement de configuration de la protéine?) d'un meilleur transfert intercytoplasmique. D'autres substances agissant sur d'autres types de connexines sont également des induc-

teurs de la communication jonctionnelle intercellulaire. L'élucidation des mécanismes d'action de ces substances est nécessaire afin de les employer au mieux lors de thérapies utilisant la stratégie *HSV-tk/ganciclovir*. En particulier, l'induction transcriptionnelle des gènes de connexines par des substances appropriées ne pourra se faire sans une meilleure connaissance des régions promotrices de ces gènes. De plus, la plupart des données concernant la structure des gènes de connexines ou de la régulation fonctionnelle de leurs protéines nous proviennent surtout des rongeurs. Il est donc d'importance de répéter ces études sur du matériel d'origine humaine.

La transfection *in vitro* de gènes de connexines dans des cellules non communicantes est suivie du rétablissement de la communication jonctionnelle intercellulaire. Cela a été montré par différents laboratoires en utilisant différents types cellulaires [14, 23-25]. *In vivo*, le transfert de gènes de connexines dans des cellules tumorales devrait conduire également à l'établissement d'une meilleure communication intercellulaire. On peut donc imaginer une thérapie génique antitumorale employant la co-transduction des gènes d'une connexine et de *HSV-tk* afin d'obtenir un effet *bystander* plus efficace. En collaboration avec le Dr Finocchiaro de l'Institut National

de Neurologie C. Besta (Milan, Italie), c'est ce que nous avons observé: la transduction dans des cellules de gliome des gènes de la connexine 43 et de la thymidine kinase de l'Herpès conduit à une résorption plus importante des tumeurs que la transduction du seul gène de la thymidine kinase (Colombo BM, Mesnil M, Sacco MG, Benedetti S, Villa A, Yamasaki H, DiDonato S, Finocchiaro G, communication personnelle). Cette thérapie génique antitumorale combinerait ainsi le gène tueur (qui synthétise la substance cytotoxique) et le gène amplificateur (qui permet la diffusion de la substance cytotoxique entre les cellules tumorales). L'utilisation des gènes de connexines serait donc particulièrement utile pour augmenter la capacité de communication des cellules tumorales et obtenir un effet *bystander* conséquent.

On sait que la connexine 43 règle négativement la multiplication des cellules de gliome [24, 26]. Il est donc difficile de savoir si la plus grande résorption des tumeurs de gliomes observée par le groupe de Finocchiaro est la conséquence d'un effet *bystander* plus efficace, à une inhibition de la multiplication cellulaire ou à ces deux phénomènes conjugués. Cela nous amène à un autre aspect intéressant des connexines qui est leur effet inhibiteur de la multiplication cellulaire.

Tableau I

EFFET SUPPRESSEUR DE TUMEUR INDUIT PAR L'EXPRESSION DE GÈNES DE CONNEXINES ; L'EFFET SEMBLE DÉPENDRE DU TYPE DE CONNEXINE NORMALEMENT EXPRIMÉ

Gène de connexine transfecté	Lignées cellulaires (connexine normalement produite)	Inhibition de la croissance		Références
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
Connexine 32	Hépatome humain (connexine 32)	-	+	23
Connexine 43	Fibroblastes transformés de souris (connexine 43)	+	+	25
	Gliome de rat (connexine 43)	+	+	24, 26
	Cellules HeLa (connexine 26)	-	-	27
Connexine 40	Cellules HeLa	-	-	27
Connexine 26	Cellules HeLa	+	+	27

Plusieurs laboratoires dont le nôtre ont montré que si bien souvent les cellules tumorales ont perdu la faculté de communiquer par les jonctions communicantes, l'induction de la synthèse de connexines et donc l'établissement de la communication intercellulaire inhibent le taux de prolifération jusqu'à produire *in vivo* un effet supprimeur de tumeur [25-27]. Nos travaux suggèrent que cet effet supprimeur de tumeur dépend à la fois du type de connexine et du type cellulaire dans lequel elle est synthétisée [27]. Ainsi, si la connexine 43 est un supprimeur de tumeur après transfection dans des cellules de gliome [26] mais aussi dans des fibroblastes transformés de souris [25], nous savons qu'elle n'en est pas un dans les cellules HeLa [27]. En revanche, la croissance des cellules HeLa *in vivo* et *in vitro* est inhibée par la transfection du gène d'un autre type de connexine, la connexine 26 [27]. Il est intéressant de noter que les cellules sensibles à la production de la connexine 43 (fibroblastes et cellules de gliome) sont connues pour la synthétiser lorsqu'elles ne sont pas tumorales. De même, la connexine 26 est synthétisée en quantité dans le col utérin d'où proviennent, à l'origine, les cellules HeLa. Ces données, encore fragmentaires, suggèrent cependant que l'effet supprimeur de tumeur serait observé si le tissu d'origine de la tumeur à traiter dans lequel on induit l'expression du gène de la connexine est normalement producteur de cette connexine (Tableau I). Si cela est confirmé, les connexines pourraient être utilisées non seulement pour la diffusion de substances cytotoxiques mais aussi pour induire parallèlement une inhibition de la prolifération tumorale. Ces deux effets conjugués pourraient ainsi induire une élimination plus efficace des tumeurs lors des thérapies utilisant la stratégie *HSV-tk/ganciclovir* ■

**Marc Mesnil
Hiroshi Yamasaki**

Service d'Études des Étapes de la Cancérogénèse, Centre International de Recherche sur le Cancer, 150, cours Albert-Thomas 69372 Lyon Cedex 08, France.

RÉFÉRENCES

1. Kaldor JM, Day NE, Pettersson F, Clarke EA, Pedersen D, et al. Leukemia following chemotherapy for ovarian cancer. *N Engl J Med* 1990; 322: 1-6.
2. Kahn A. Thérapie génique: le temps d'un premier bilan. *médecine/sciences* 1996; 12: 9-12.
3. Mannoni P. La thérapie génique du cancer: désir mythique ou réalité thérapeutique de demain? *médecine/sciences* 1996; 12: 68-72.
4. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992; 256: 1550-2.
5. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koepflin DS, Moolten FL, Abraham GN. The «bystander effect»: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993; 53: 5274-83.
6. Meda P. Connexines, canaux jonctionnels et communications cellulaires. *médecine/sciences* 1996; 12: 909-20.
7. Goldberg G, Bertram JS. Correspondance re: Z. Ram et al. *In situ* retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res* 1994; 54: 3947-8.
8. Pitts JD. Cancer gene therapy: a bystander effect using the gap junctional pathway. *Molecular Carcinogen* 1994; 11: 127-30.
9. Bi WL, Parysek LM, Warnick R, Stambrook PJ. *In vitro* evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 725-31.
10. Fick J, Barker II FG, Dazin P, Westphale EM, Beyer EC, Israel MA. The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11071-5.
11. Yamasaki H, Katoh F. Novel method for selective killing of transformed rodent cells through intercellular communication, with possible therapeutic applications. *Cancer Res* 1988; 48: 3203-7.
12. Yamasaki H, Hollstein M, Mesnil M, Martel N, Aguelon AM. Selective lack of intercellular communication between transformed and nontransformed cells as a common property of chemical and oncogene transformation of BALB/c 3T3 cells. *Cancer Res* 1987; 47: 5656-64.
13. Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1831-5.
14. Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Fraté H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hülser DF, Willecke K. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 1995; 129: 805-17.
15. Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, Kucharczuk JC, Spray DC, Fishman GI, Amin KM, Kaiser LR, Albelda SM. Gap junctions play a role in the «bystander effect» of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system *in vitro*. *Gene Therapy* 1996; 3: 85-92.
16. Samejima Y, Meruelo D. «Bystander killing» induces apoptosis and is inhibited by forskolin. *Gene Therapy* 1995; 2: 50-8.
17. Vile RG, Nelson JA, Castleden S, Chong H, Hart IR. Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component. *Cancer Res* 1994; 54: 6228-34.
18. Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Blaese M, Oldfield EH. *In situ* retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res* 1993; 53: 83-8.
19. Mesnil M, Yamasaki H. Le cancer, un problème de communication? *La Recherche* 1994; 261: 76-8.
20. Mesnil M, Oyamada M, Fitzgerald DJ, Jongen WMF, Krutovskikh V, Yamasaki H. Gap junctional communication alterations at various regulatory levels of connexin expression and function during animal and human carcinogenesis. *Prog Cell Res* 1993; 3: 311-6.
21. Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids up-regulate connexin 43 gene expression independently of their pro-vitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res* 1992; 52: 5707-12.
22. Mehta PP, Yamamoto M, Rose B. Transcription of the gene for the gap junctional channel protein connexin 43 and expression of functional cell-to-cell channels are regulated by cAMP. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 839-50.
23. Eghbali B, Kessler JA, Reid LM, Roy C, Spray DC. Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin 32 cDNA retards growth *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10701-5.
24. Zhu D, Caveney S, Kidder GM, Naus CCG. Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: analysis of expression, intercellular coupling, and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1883-7.
25. Rose B, Mehta PP, Loewenstein WR. Gap-junction protein gene suppresses tumorigenicity. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1073-5.
26. Naus CCG, Elisevich K, Zhu D, Belliveau DJ, Del Maestro RF. *In vivo* growth of C6 glioma cells transfected with connexin 43 cDNA. *Cancer Res* 1992; 52: 4208-13.
27. Mesnil M, Krutovskikh V, Piccoli C, Elfgang C, Traub O, Willecke K, Yamasaki H. Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin species specificity. *Cancer Res* 1995; 55: 629-39.

TIRÉS À PART

M. Mesnil.