

médecine/sciences 1999 ; 15 : 625-34

# Thérapie génique anticancéreuse par gènes suicides: du gène à l'essai thérapeutique

# Olivier Boyer David Klatzmann

Le premier système de gène suicide développé pour un usage de thérapie génique utilise la thymidine kinase du virus *Herpes simplex* de type 1 (HSV1-TK). Cette enzyme est capable de phosphoryler le ganciclovir, un analogue nucléosidique dont la forme triphosphate est fortement toxique pour les cellules en division. Dans ce système, la toxicité induite est conditionnelle, restreinte aux cellules en cycle et engendre un important effet de voisinage assurant la destruction de cellules tumorales non transduites. Cette approche a été largement validée par des études précliniques chez l'animal et fait maintenant l'objet de nombreux essais cliniques. Les premiers résultats ont révélé une excellente tolérance à la thérapie génique par gène suicide. Toutefois, l'efficacité du traitement reste aujourd'hui limitée par l'efficacité du transfert de gène. L'amélioration des vecteurs, l'optimisation des méthodologies de ciblage ainsi qu'une meilleure compréhension de l'effet de voisinage, et notamment sa composante immunologique, devraient maintenant permettre d'améliorer l'efficacité thérapeutique.

## ADRESSES .

O. Boyer: docteur en médecine, docteur ès sciences, assistant hospitalo-universitaire. D. Klatzmann: docteur en médecine, docteur ès sciences, professeur des universités, praticien hospitalier. Laboratoire de biologie et thérapeutique des pathologies immunitaires, CERVI, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47-83, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France.

### TIRÉS À PART

D. Klatzmann.

l existe de nombreuses situations cliniques pour lesquelles l'objectif thérapeutique principal est de détruire des cellules plutôt que de les réparer. C'est notamment le cas du traitement du cancer où il n'est pas nécessaire d'obtenir la «rédemption» de la cellule tumorale mais tout simplement son élimination. Le transfert de gènes capables d'entraîner une toxicité sélective dirigée contre les cellules transduites offre de nouvelles perspectives pour atteindre cet objectif.

# Concept et propriétés des gènes suicides: le système TK/GCV

Les gènes codant pour les toxines, notamment d'origine bactérienne, ne sont pas adaptés à un usage de thérapie génique. En effet, ces toxines sont très (trop) puissantes et leur usage nécessiterait un contrôle parfait du ciblage et de la transcription du gène dans les cellules à détruire. En outre, leur toxicité est incompatible avec l'obtention de lignées cellulaires productrices de virus recombinants, et elles ne pourraient donc être utilisées qu'avec des vecteurs non viraux. Pour toutes ces raisons, des systèmes capables de contrôler une toxicité conditionnelle ont été développés. Leur principe général est d'utiliser des gènes codant pour une protéine conférant une activité enzymatique normalement absente des cellules cibles de la thérapeutique, et qui permet le métabolisme d'une pro-molécule non toxique en un composé hautement toxique. Ainsi, l'activité toxique du système est parfaitement contrôlée par l'administration de la pro-molécule, que ce soit in vitro pour la production des vecteurs recombinants ou in vivo lors d'une utilisation clinique.

Le premier système de gène suicide développé pour un usage de thérapie génique utilise l'activité enzymatique de la thymidine kinase du virus Herpes simplex de type 1 (HSV1-TK). L'origine de ce système remonte aux travaux de G. Elion et al. sur la mise au point d'analogues nucléosidiques antiherpétiques. C'est ainsi qu'ont été développés l'aciclovir (ACV) [1] et le ganciclovir (GCV) [2], deux analogues nucléosidiques de la guanosine qui ne sont pas (ou très peu) phosphorylés par les kinases cellulaires. En revanche, ces deux analogues nucléosidiques sont très efficacement métabolisés par la HSV1-TK en un composé monophosphorylé qui est ensuite transformé en métabolites di- et triphosphates (TP) par des enzymes cellulaires (figure 1A). L'activité antiherpétique de l'ACV-TP et du GCV-TP est fondée en partie sur l'inhibition de la réplication virale ainsi que sur l'induction de la mort des cellules infectées par incorporation du GCV-TP dans les chaînes d'ADN en cours d'élongation [3, 4]. Plus tard, Moolten a montré que la transfection du seul gène HSV1-TK, en dehors de toute infection virale, suffisait à induire la mort cellulaire lorsque les cellules sont traitées par le ganciclovir [5].

Depuis, de nombreux groupes ont montré que l'expression d'*HSV1-TK* dans différents types cellulaires, qu'il s'agisse de lignées de cellules tumorales ou de cellules primaires, permet de tuer ces cellules *in vitro* avec des concentrations de ganciclovir qui sont habituellement 100 à 10 000 fois

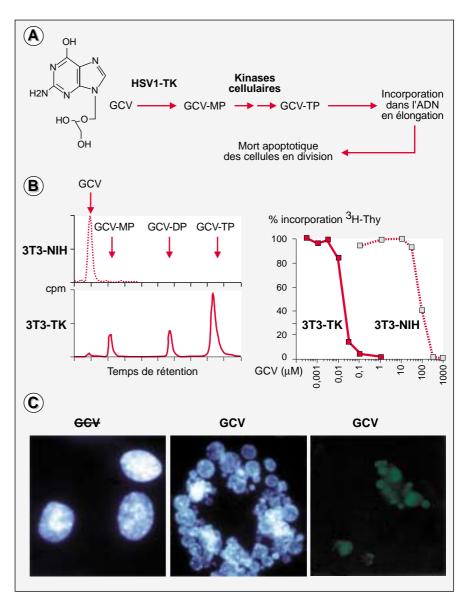


Figure 1. *Principe des gènes suicides: le système HSV1-TK/GCV. A.* Le ganciclovir (GCV), pro-médicament inactif, est phosphorylé en GCV monophosphate (GCV-MP) par HSV1-TK, à la différence des kinases cellulaires qui sont incapables de catalyser cette étape. Le GCV-MP est ensuite métabolisé en GCV di- puis triphosphate (GCV-TP) par des kinases cellulaires. Le GCV-TP est alors incorporé dans l'ADN en élongation, entraînant la mort des cellules en division. **B.** Profil de phosphorylation du GCV radiomarqué en chromatographie FPLC. Les fibroblastes 3T3-NIH sont incapables de phosphoryler le GCV. L'expression de HSV1-TK (3T3-TK) permet la formation de GCV-TP. L'IC $_{50}$  de ces cellules devient alors inférieure à 0,1  $\mu$ M, soit une concentration de GCV inférieure d'au moins trois  $\log_{10}$  à l'IC $_{50}$  des cellules 3T3-NIH parentales. **C.** Mort cellulaire induite par le GCV. Les fibroblastes HSV1-TK<sup>+</sup> en division incorporent le GCV-TP dans l'ADN en élongation, induisant l'apoptose (bleu, coloration nucléaire par Hoescht 33342; vert, fragmentation de l'ADN objectivée par la méthode TUNEL).

626 m/s n° 5. vol. 15. mai 99

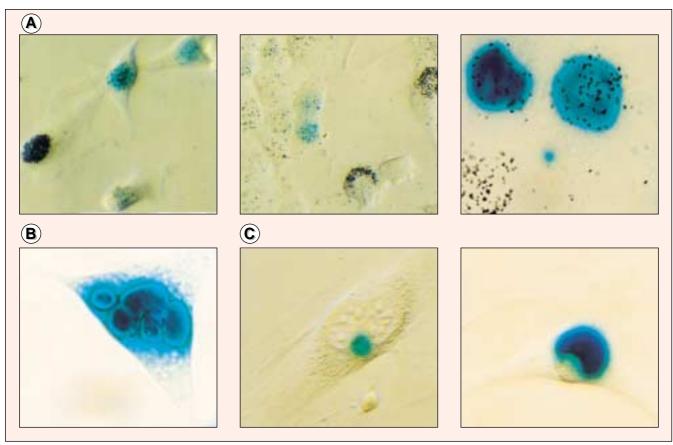


Figure 2. **Effet de proximité in vitro**. Des fibroblastes HSV1-TK-/lacZ+ sont co-cultivés avec des fibroblastes HSV1-TK+/lacZ-. Les premiers présentent une coloration nucléaire bleue après action d'un substrat chromogène mais n'incorporent pas l'iodo-désoxycitidine (IDC) radio-marquée. Les seconds ne sont pas colorés en bleu mais incorporent l'IDC (grains noirs nucléaires à l'autoradiographie). **A.** La présence de cellules à noyau bleu et grains noirs indique le passage d'IDC phosphorylé d'une cellule HSV1-TK+/lacZ- vers une cellule HSV1-TK-/lacZ+. La fréquence d'apparition de ces cellules dépend de la densité de la culture, et donc de la probabilité de contacts cellulaires. **B.** La mort cellulaire induite par le GCV entraîne la formation de corps apoptotiques. **C.** Les cellules peuvent capter de tels corps apoptotiques libérés par des cellules avoisinantes, ce qui déclenche alors l'apoptose.

inférieures aux concentrations toxiques pour les cellules n'exprimant pas HSVI-TK (10 à 100 fois seulement pour l'aciclovir), ce qui explique que cette molécule n'est pas utilisée pour une application antitumorale [6, 7] (figure 1B). La mort cellulaire résulte du blocage de l'élongation de l'ADN par incorporation du GCV-TP qui conduit au déclenchement d'une apoptose cellulaire, d'où le terme de « gène suicide » (figure 1C). Ce mécanisme d'action implique donc une toxicité restreinte aux cellules en division.

# L'effet de voisinage in vitro

L'efficacité du système HSV1-TK/GCV au niveau unicellulaire est excellente. Cependant, l'utilisation de cette stratégie pour le traitement de tumeurs qui peuvent contenir plusieurs milliards de cellules ne serait pas envisageable s'il était nécessaire de transférer le gène dans chacune des cellules tumorales. En fait, il est d'emblée apparu qu'in vitro comme in vivo, il suffit qu'une fraction des cellules (parfois de moins de 5%) d'une culture ou d'une masse tumorale exprime le gène HSV1-TK pour que la totalité des cellules soit détruite par le ganciclovir [5].

Le mécanisme de cet «effet de voisinage» est probablement multifactoriel. *In vitro*, le transfert d'un métabolite phosphorylé du ganciclovir de cellule à cellule, par l'intermédiaire de jonctions communicantes (gap junctions), semble être le mécanisme moléculaire le plus important (figure 2) [8, 9]. Néanmoins, un effet de voisinage persiste lors de l'utilisation de lignées cellulaires déficientes en connexines et donc incapables d'établir de telles jonctions. Cela suggère l'intervention d'autres mécanismes, notamment la transmission d'un signal apoptotique qui pourrait impliquer le captage de corps apoptotiques par les cellules non transduites (figure 2) [10]. Il convient de noter qu'il n'y a pas d'effet de voisinage in vitro lors de l'utilisation de cellules poussant en suspension, comme les cellules lymphoïdes [11,

Le système HSV1-TK/GCV possède donc plusieurs propriétés particulièrement avantageuses pour une utilisation en thérapie génique anticancéreuse. La toxicité est conditionnelle, parfaitement contrôlée par l'administration de la pro-molécule; l'index thérapeutique est très élevé; la toxicité est restreinte aux cellules en division; il existe un important effet de voisinage.

## Les autres systèmes de gène suicide/ pro-molécule

Plusieurs autres systèmes de gènes suicides et de pro-molécules ont été développés pour une éventuelle utilisation en thérapie génique [7]. Le gène bactérien codant pour la cytosine désaminase - dont la fonction physiologique est de transformer la cytosine en uracile - est également capable de transformer la 5-fluorocytosine en 5-fluoro-uracile, une molécule très toxique déjà utilisée en chimiothérapie anticancéreuse. La xantine-guanine phosphoribosyl transférase d'Escherichia coli transforme un analogue de la xantine, la 6-thioxantine, en un composé qui s'incorpore à l'ADN en réplication, entraînant la mort cellulaire. Le cytochrome P450-2B1 est capable de transformer le cyclophosphamide en son métabolite actif, le 4-hydroxycyclophosphamide [13]. Ce composé est instable et donne naissance spontanément à du phosphoramide moutarde et à de l'acroléine. Cette dernière se fixe de façon covalente à l'ADN, entraînant la mort cellulaire lors d'une réplication ultérieure de l'ADN. Cette propriété est intéressante car la toxicité ne nécessite pas la division cellulaire au moment du traitement, mais n'est révélée que lors d'une division ultérieure. Ces différents systèmes de gènes suicides pourraient représenter des alternatives au système HSV1-TK/GCV ou être utilisés de façon conjointe, avec ou sans radiothérapie concomitante, dans la mesure où il existe alors souvent un phénomène supra-additif de leurs effets [14-17].

# Thérapie génique de tumeurs solides expérimentales chez l'animal

Les premières démonstrations d'une efficacité des gènes suicides pour une thérapie génique antitumorale ont été obtenues après transfert de gène par des rétrovirus recombinants. Comme l'efficacité du transfert de gènes par injection des cellules d'encapsidation dans les tumeurs est plus efficace que par injection des particules rétrovirales purifiées [18], c'est cette stratégie qui a été utilisée pour le traitement de tumeurs cérébrales et de métastases hépatiques chez le rat.

Culver et al. ont injecté, par voie stéréotaxique, des cellules gliomateuses dans un hémisphère cérébral [19]. Cinq jours plus tard, des cellules d'encapsidation produisant des rétrovirus recombinants véhiculant HSV1-TK ont été injectées au même site. Les auteurs ont alors observé une absence de développement tumoral chez 11 animaux sur 14 à l'issue d'un traitement de cinq jours par le ganciclovir. Ce modèle a montré qu'il était possible de prévenir le développement de tumeurs microscopiques mais ne permettait pas d'évaluer le traitement de tumeurs macroscopiques, trop rapidement létales. L'efficacité de ce système pour le traitement de tumeurs établies a été montrée dans un modèle de métastases hépatiques de cancer colique [20]. Les cellules d'encapsidation étaient alors injectées directement dans les nodules macroscopiques lors d'une laparotomie. Après traitement par le ganciclovir, il a été observé une réduction significative de la taille des tumeurs qui sont même apparues entièrement détruites dans un grand nombre de cas, et remplacées alors par une cicatrice fibreuse sans atteinte du parenchyme sain avoisinant (figure 3).

Les gènes suicides ont maintenant été utilisés dans de nombreux systèmes de tumeurs expérimentales, de différente nature histologique et affectant différents tissus ou organes. Dans ces expériences, le gène suicide était véhiculé par différents types de vecteurs, des rétrovirus [21], des adénovirus [22] ou des herpèsvirus recombinants [23]. Dans la plupart des cas, une excellente efficacité antitumorale a pu être obtenue. Il convient de noter que les doses de ganciclovir utilisées dans ces expériences (50-150 mg/kg/jour) sont plus élevées que celles utilisées chez l'homme (10 mg/kg/jour). Toutefois, en raison de pharmacocinétiques différentes, ces doses aboutissent généralement à des concentrations plasmatiques équivalentes chez l'homme et chez le rongeur. Il n'existe que peu d'études comparant différents systèmes d'administration du gène suicide. C'est toutefois le cas du glioblastome dans lequel le transfert du gène suicide par injection de vecteurs adénoviraux ou de cellules d'encapsidation a permis d'obtenir une efficacité équivalente appréciée sur les courbes de survie des animaux traités [24].

Toutes ces expériences ont utilisé des modèles de tumeurs dites « transplantées », qui sont obtenues par injection en différents sites de lignées tumorales cultivées in vitro. Ces modèles sont classiquement utilisés pour l'évaluation de toute stratégie thérapeutique antitumorale, qu'elle soit de chimiothérapie ou de thérapie génique. Cependant, ces tumeurs diffèrent notablement des tumeurs spontanées telles qu'elles apparaissent chez l'homme. Nous avons récemment observé une excellente efficacité d'un traitement par gène suicide dans un modèle de tumeur mammaire se développant in situ à la suite de l'administration d'un agent carcinogène chez le rat [25].

# L'effet de voisinage in vivo

Ces différentes expérimentations animales ont révélé l'importance de l'effet de voisinage pour expliquer l'efficacité antitumorale. En effet, quelles que soient les tumeurs et les méthodes de transfert de gènes, le pourcentage de cellules transduites dépasse rarement 10%. La destruction de la totalité d'une masse tumorale par le système HSV1-TK/GCV implique donc l'existence d'un important effet de voisinage *in vivo* dont les mécanismes semblent de nature essentiellement immunologique.

Les premiers arguments allant dans ce sens ont été l'observation d'une infiltration importante des tumeurs traitées par des cellules du système immunitaire, aussi bien des cellules présentatrices d'antigènes que des lymphocytes T CD4+ et CD8+ [20]. Cette infiltration est constamment retrouvée dans tous les modèles

tumoraux que nous avons étudiés. La démonstration de l'implication du système immunitaire dans l'effet de voisinage est ensuite venue d'expériences réalisées chez des animaux immunodéprimés chez lesquels l'efficacité thérapeutique du système est toujours diminuée. Ainsi, nous avons observé que le traitement de métastases hépatiques de cancers colorectaux par le système HSV1-TK/GCV est deux fois moins efficace chez la souris *nude* que chez des souris immunocompétentes [26].

L'implication du système immunitaire dans l'effet de voisinage nous a amenés à nous interroger sur la possibilité que cet effet opère non seulement au niveau d'une tumeur traitée mais puisse également agir sur les tumeurs non traitées à distance, ce qui pourrait avoir une importance thérapeutique pour le traitement de tumeurs métastatiques. Nous avons pu ainsi montrer que le traitement par le ganciclovir d'une métastase hépatique exprimant HSV1-TK aboutit non seulement à l'éradication de cette tumeur mais aussi à une diminution très significative du volume de plusieurs autres métastases hépatiques implantées dans un autre lobe hépatique (figure 3) [27]. L'absence d'utilisation de vecteur viral dans ces expériences élimine la possibilité d'un transfert de gène dans les métastases non traitées et l'absence de contact entre les différentes métastases élimine toute possibilité de transfert direct de métabolites du ganciclovir. En revanche, toutes les métastases se sont révélées infiltrées par des cellules du système immunitaire. Dans le système des tumeurs mammaires chimio-induites, nous avons également observé une infiltration lymphocytaire avec régression de toutes les localisations tumorales alors que les vecteurs rétroviraux n'étaient injectés que dans l'une de ces tumeurs multiples (figure 3) [25]. Enfin, l'effet de voisinage est également observé lors du traitement de tumeurs cérébrales expérimentales et peut s'accompagner du développement d'une réponse immunitaire antitumorale [22, 28, 29].

Les mécanismes immunologiques de l'effet de voisinage ne sont pas connus avec précision à l'heure actuelle, en particulier en ce qui concerne la nature des effecteurs cellulaires impliqués et la participation d'une réponse immunitaire dirigée contre le vecteur lui-même. Il pourrait impliquer au moins partiellement la production de cytokines [30, 31].

Au total, ces résultats suggèrent que l'effet de voisinage *in vivo* possède une composante immunologique majeure dont l'action s'exerce non seulement sur les tumeurs traitées mais également sur les tumeurs à distance. L'élucidation de ses mécanismes devrait permettre d'amplifier cet effet et d'améliorer l'efficacité du traitement.

# Gènes suicides et hémopathies malignes

En raison de leur caractère disséminé, les hémopathies malignes se prêtent peu ou pas aux stratégies d'administration intratumorale de vecteurs de transfert de gènes. La première utilisation des gènes suicides dans ce cadre a été proposée en 1990 par Moolten et al. dans un modèle de souris transgéniques exprimant HSV1-TK dans les lymphocytes [32]. Chez ces animaux, il a été possible d'obtenir des régressions d'un lymphome viro-induit par administration de ganciclovir. Ces résultats restent toutefois limités pour ce qui concerne une éventuelle application clinique dans la mesure où il ne semble pas possible de cibler efficacement la totalité des cellules lymphomateuses et qu'il n'y a pas d'effet de voisinage avec ce type de cellules. En 1991, nous avons proposé une approche différente reposant sur le contrôle pharmacogénétique de la réponse immunitaire dans le cadre des greffes de moelle osseuse allogéniques [33]. En effet, dans plusieurs types de leucémies, la présence de lymphocytes T dans le greffon médullaire est associée à un puissant effet antitumoral ainsi qu'à des effets bénéfiques sur la prise de greffe et la reconstitution immunitaire. Toutefois, leur présence est également associée à un risque élevé de maladie du greffon contre l'hôte (GVH, graft versus host) au pronostic redoutable. Il en résulte un véritable dilemme puisque la présence des lymphocytes T expose le patient à la GVH alors que leur absence du greffon entraîne la survenue fréquente de rechutes leucémiques [34]. L'utilisation d'un greffon médullaire déplété en lymphocytes T, supplémenté en lymphocytes T du donneur exprimant *HSV1-TK*, permet de prévenir efficacement la survenue d'une GVH mortelle lors de l'administration de ganciclovir [11, 35, 36]. L'intérêt de cette approche est son apparente sélectivité pour les lymphocytes T responsables de la GVH (lymphocytes T alloréactifs en division, activés au contact des cellules du receveur et donc sensibles au ganciclovir) et l'absence d'immunosuppression généralisée qui en résulte.

# Étude de la toxicité du système chez l'animal

Les expérimentations animales réalisées aussi bien chez le rongeur que chez le primate ont montré une bonne tolérance à l'injection des cellules d'encapsidation produisant les rétrovirus recombinants véhiculant HSV1-TK [37]. En revanche, l'injection intracérébrale, chez le singe, de vecteurs adénoviraux véhiculant HSV1-TK a entraîné des effets secondaires graves, majorés après traitement par le ganciclovir, et parfois mortels [38, 39]. Pour ce même type de vecteur, les injections hépatiques ont également donné lieu à une importante toxicité [40, 41]. Dans ce dernier cas, les résultats suggèrent que la toxicité hépatocytaire du ganciclovir pourrait s'observer en l'absence de prolifération cellulaire.

# Études cliniques

Un grand nombre de protocoles thérapeutiques fondés sur l'utilisation du système HSV1-TK/GCV dans le domaine du cancer ont été débutés dans le monde [42]. A ce jour, les résultats de six principales études ont été publiés.

Le premier protocole de thérapie génique fondé sur l'utilisation des gènes suicides s'adressait à des patients présentant des tumeurs cérébrales de types très variés (tumeurs gliales, mais aussi métastases) qui recevaient des injections stéréotaxiques de cellules d'encapsidation véhiculant *HSV1-TK*, sans exérèse neurochirurgicale [43]. Les résultats de cette étude ont été perçus comme plutôt négatifs, dans la mesure où l'efficacité du transfert de gènes semblait très modeste et l'efficacité cli-

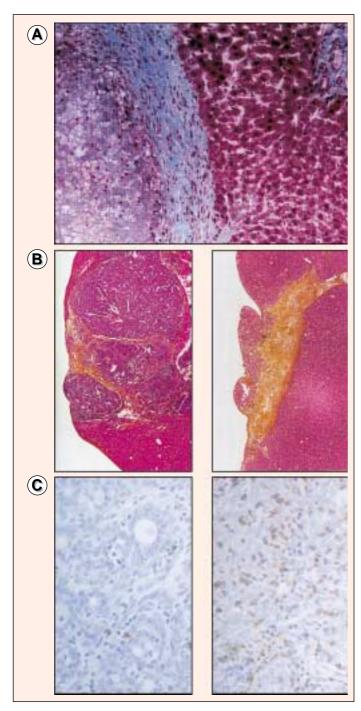


Figure 3. Effet de gènes suicides sur des tumeurs expérimentales in vivo. A. Injection de cellules d'encapsidation produisant des vecteurs rétroviraux HSV1-TK dans un adénocarcinome expérimental hépatique chez le rat. Après 5 jours de ganciclovir, la destruction tumorale est totale, entourée par de la fibrose avec présence d'un infiltrat mononucléé et respect du parenchyme sain environnant. B. Effet de proximité s'exercant sur une tumeur HSV1-TK⁻ après traitement par le ganciclovir (droite) lorsque celle-ci est située à disd'une tance tumeur HSV1-TK⁺ dans le foie (gauche, ici avant ganciclovir). C. Immunodétection d'un infiltrat lymphocytaire CD8 au sein d'une tumeur mammaire chimio-induite traitée in situ par HSV1-TK avant (gauche) et après (droite) administration de ganciclovir.

nique difficile à évaluer [44]. Cependant, plusieurs données viennent relativiser ces conclusions. Tout d'abord, comme cela est précisé par les auteurs, ce protocole a été réalisé avec une lignée d'encapsidation produisant des rétrovirus recombinants avec un titre très faible, 100 fois inférieur aux lignées maintenant utilisées par ce même groupe ou par d'autres équipes. Ce titre faible était proba-

blement lié à la présence d'un site de polyadénylation interne au gène *HSV1-TK* utilisé, ce qui réduisait considérablement le nombre des transcrits fonctionnels produits dans les cellules d'encapsidation. Les auteurs ont supprimé ce site dans un second vecteur retroviral, obtenant alors des titres infectieux 100 fois plus élevés [45]. Par ailleurs, la stratégie d'injection stéréotaxique sans

exérèse chirurgicale de la tumeur pourrait ne pas être optimale pour le traitement de tumeurs cérébrales. En effet, l'injection d'un volume relativement important de liquide contenant les cellules d'encapsidation s'accompagne d'une augmentation de la pression intracrânienne et, très probablement, d'une fuite du produit injecté vers le centre de la tumeur qui est souvent nécrotique. Il faut néanmoins noter l'existence de certains éléments d'efficacité, comme la disparition de résidus tumoraux, mise en évidence par imagerie par résonance magnétique (IRM) au décours du traitement par le ganciclovir. Enfin, une autre publication a récemment apporté des éléments supplémentaires sur la bonne tolérance de cette approche [46]. Nous avons réalisé deux essais cliniques portant sur le traitement du mélanome métastatique et du glioblastome [47, 48]. Les résultats obtenus à ce jour sur plus d'une trentaine de patients montrent tout d'abord que ce traitement est très bien toléré. En effet, dans ces deux études, nous

blastome [47, 48]. Les résultats obtenus à ce jour sur plus d'une trentaine de patients montrent tout d'abord que ce traitement est très bien toléré. En effet, dans ces deux études, nous n'avons observé aucun effet secondaire grave lié au traitement (grade OMS supérieur à 2) [49, 50]. En outre, nous avons pu réaliser des injections répétées des cellules d'encapsidation sans effet secondaire notable (3 injections dans les mêmes nodules métastatiques de mélanome malin à 5 jours d'intervalle). Cette bonne tolérance est un élément essentiel pour la suite du développement de ces thérapeutiques.

Pendant l'administration du ganciclovir, il a été observé une réduction modeste du volume des métastases de mélanome traitées. Par ailleurs, l'étude histologique des tumeurs a montré, chez plusieurs patients, une augmentation de la nécrose tumorale après traitement. Cependant, une progression de la maladie a été observée dans tous les cas. Ces résultats sont à mettre en rapport avec la relative inefficacité du transfert de gène qui se heurte à la survie très courte des cellules d'encapsidation en raison de leur origine murine. Ces cellules xénogéniques sont en effet rapidement lysées in vitro par le sérum humain non décomplémenté, du fait notamment de la présence d'anticorps naturels dirigés contre certains motifs glucidiques absents

des cellules humaines [51]. L'utilisation de cellules d'encapsidation d'origine humaine devrait permettre une survie plus prolongée des cellules et une amélioration du transfert de gènes [52].

Pour le traitement du glioblastome, l'efficacité thérapeutique a été évaluée, d'une part, par l'étude des récidives tumorales en IRM et, d'autre part, par l'analyse de la survie des patients. De façon similaire aux résultats de Ram et al. [43], nous avons pu observer, chez certains patients, des images de régression de la prise de contraste IRM postopératoire immédiate, image considérée comme un résidu tumoral. Ces éléments sont donc évocateurs de la destruction d'une zone tumorale non réséquée en totalité lors de l'intervention neurochirurgicale. Le critère d'efficacité (absence de récidive tumorale visible à l'IRM 4 mois après l'intervention) a été atteint pour 4 des 18 premiers patients traités. Alors que la survie médiane des patients non répondeurs est d'environ 7 mois - une valeur comparable à celle des survies habituellement observées dans ce type de maladie -, elle est significativement augmentée à environ 18 mois chez les patients répondeurs. Bien que l'interprétation d'un cas unique doive rester prudente, une survie sans récidive de 3 ans a été obtenue chez une patiente, ce qui reste exceptionnel dans le cas d'un glioblastome à ce stade d'évolution.

Ces résultats soulignent la différence entre l'utilisation des cellules d'encapsidation d'origine murine pour traiter des tumeurs périphériques ou des tumeurs cérébrales. La survie des cellules d'encapsidation murines est meilleure dans le système nerveux central, probablement parce que le liquide céphalorachidien n'a qu'une faible activité lytique antixénogénique comparativement à celle du sérum [53].

Il n'existe à ce jour qu'un seul rapport publié concernant une étude clinique utilisant des adénovirus véhiculant *HSV1-TK* [54]. L'injection intrapleurale de tels virus jusqu'à des doses de 10<sup>12</sup> ufp (unités formant plages) a été relativement bien tolérée chez des patients qui présentaient un mésothéliome. Le transfert de gène a pu être détecté chez 11 des 20 patients analysables,

ceux ayant reçu les plus fortes doses de virus injectées (≥ 10¹¹ ufp). L'efficacité clinique du traitement n'était pas évaluable dans cette étude de phase I regroupant des patients à des stades très divers de leur maladie. Dans le domaine des tumeurs cérébrales, des essais cliniques utilisant des adénovirus HSV1-TK sont en cours [55]. Leurs résultats permettront d'évaluer la tolérance et l'efficacité de ces vecteurs par rapport aux rétrovirus.

Enfin, dans le domaine des hémopathies malignes, l'étude pilote de Bordignon et al. a montré que l'on pouvait obtenir un effet antitumoral chez des patients présentant un lymphome lié au virus d'Epstein-Barr ou une rechute leucémique après une greffe de moelle osseuse déplétée en lymphocytes T grâce à l'administration différée de lymphocytes T génétiquement modifiés HSV1-TK+ du même donneur [56]. Dans ce protocole, l'administration de ganciclovir a permis de contrôler deux cas de GVH aiguë qui se sont déclarés après administration de ces lymphocytes T. D'autres essais cliniques, reposant sur l'utilisation de lymphocytes T HSV1-TK+, sont en cours [57, 58].

# Perspectives

Comme toute autre thérapeutique nouvelle, la thérapie génique fait l'objet d'un développement clinique progressif qui devra répondre successivement à des questions concernant la sécurité et la tolérance au traitement (essais de phases I et I-II), les premières indications d'efficacité (phase II) et la démonstration d'une efficacité grâce à des essais contrôlés (phases II-III et III).

Des données publiées aujourd'hui sur l'utilisation de HSV1-TK dans la thérapie génique antitumorale montrent que l'utilisation de ce système est en général très bien tolérée. La plupart des thérapeutiques anticancéreuses radiothérapiques ou chimiothérapiques entraînent généralement des effets secondaires importants chez des patients dont l'espérance de vie est réduite. La bonne tolérance de la thérapie génique par gènes suicides permet de continuer le développement de cette approche même si son efficacité reste aujourd'hui encore modeste, en termes de bénéfice thé-

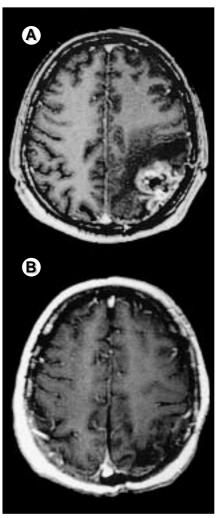


Figure 4. Effet de la thérapie génique du glioblastome chez l'homme. Imagerie par résonance magnétique nucléaire avant (A) et 15 mois après traitement (B) par injection de cellules d'encapsidation murines produisant un vecteur rétroviral HSV1-TK, et 14 jours de ganciclovir chez un patient répondeur.

rapeutique individuel comme de fraction des patients répondeurs. Il est important de mentionner que l'approche HSV1-TK/GCV est la première à avoir donné lieu à un essai de phase III randomisé dont les résultats devraient permettre de juger de l'efficacité du vecteur et de la procédure utilisés.

L'efficacité du transfert de gènes nous semble aujourd'hui la première limitation de l'efficacité thérapeutique. Nous avons déjà discuté de la survie trop courte des cellules d'origine murine injectées dans les tumeurs périphériques, probablement responsable d'un transfert de gènes insuffisant. De la même manière, les données de notre essai sur le glioblastome nous permettent de penser que le facteur principal conditionnant la réponse au traitement tient à la modalité d'administration du vecteur. En effet, les injections de cellules d'encapsidation sont réalisées de façon aussi homogène que possible sur l'ensemble des marges de la cavité opératoire. Cependant, la diffusion de ces cellules aux sites d'injection est probablement très limitée et le ciblage correct des reliquats tumoraux postopératoires est donc relativement aléatoire. L'amélioration des vecteurs et des stratégies de ciblage pourrait donc permettre d'améliorer l'efficacité du transfert de gènes et ainsi l'efficacité thérapeutique. En effet, le système des gènes suicides paraît présenter toutes les qualités requises pour obtenir une excellente efficacité pour peu que le transfert de gènes soit suffisant. Enfin, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'effet de voisinage et notamment sa composante immunologique devrait permettre d'améliorer encore l'efficacité du système en utilisant mieux cet effet. A ce titre, il conviendra d'analyser les contributions respectives à l'effet thérapeutique de la mort cellulaire induite par le ganciclovir et de l'injection de cellules xénogéniques.

#### Remerciements

Nous tenons à remercier les nombreux collaborateurs impliqués dans les expérimentations précliniques et dans les essais thérapeutiques (promotion Assistance publique-Hôpitaux de Paris): en particulier, M. Grisoni et L. Loubière (études in vitro); B. Sacre-Salem et J.L. Salzmann (histologie); J.L. Cohen (greffe de moelle); B. Marro, D. Dormont et C. Marsault (neuroradiologie); C.A. Valéry et J. Philippon (essai glioblastome); P. Chérin, A. Coutellier et S. Herson (essai mélanome); E. Chartier-Kastler (exérèses chirurgicales, essai mélanome); G. Bensimon (méthodologie des essais) et les autres membres du Groupe d'études des thérapies géniques des tumeurs cérébrales [48] et du Groupe d'études des thérapies géniques du mélanome malin [47]. Nous remercions également la Faculté de médecine Pitié-Salpêtrière (Université Pierre-et-Marie-Curie), l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, le Centre National de la Recherche Scientifique et Genopoietic SA.

Il a fallu 20 ans d'efforts combinés de chercheurs, médecins, chirurgiens et industriels pour que la greffe d'organe passe du statut de thérapeutique expérimentale, occasionnellement efficace, à celui d'un traitement éprouvé qui a bouleversé le pronostic de nombreuses maladies. Il est prévisible que des efforts du même ordre seront nécessaires avant d'aboutir à un résultat équivalent pour la thérapie génique, peut-être plus rapidement toutefois, compte tenu des progrès rapides de la technologie

#### RÉFÉRENCES I

- 1. Elion G. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12 (suppl B): 9-17.
- 2. Fyfe JA, Keller PM, Furman PA, Miller RL, Elion GB. Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral coumpound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *J Biol Chem* 1978; 253: 8721-7.
- 3. Nishiyama Y, Rapp F. Anticellular effects of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine against herpes simplex virus-transformed cells. *J Gen Virol* 1979; 45: 227-30.
- 4. St. Clair MH, Lambe CU, Furman PA. Inhibition by ganciclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 844-9.
- 5. Moolten F. Tumor sensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 1986; 46: 5276-81.
- 6. Heyman RA, Borrelli E, Lesley J, et al. Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2698-702.
- 7. Moolten FL. Drug sensitivity (suicide) genes for selective cancer chemotherapy. Cancer Gene Ther 1994; 1: 279-87.
- 8. Bi LW. *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.
- 9. Pitts JD. Cancer gene therapy: a bystander effect using the gap junctional pathway. *Mol Carcinog* 1994; 11: 127-30.
- 10. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA. The «bystander effect»: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993; 53: 5274-83.
- 11. Tiberghien P, Reynolds CW, Keller J, et al. Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? Blood 1994; 84: 1333-41.

- 12. Kamogawa Y, Minasi LA, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell* 1993; 75: 985-95.
- 13. Wei MX, Tamiya T, Chase M, *et al.* Experimental tumor therapy in mice using the cyclophosphamide- activating cytochrome P450 2B1 gene. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 969-78.
- 14. Freytag SO, Rogulski KR, Paielli DL, Gilbert JD, Kim JH. A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1323-33.
- 15. Advani SJ, Sibley GS, Song PY, et al. Enhancement of replication of genetically engineered herpes simplex viruses by ionizing radiation: a new paradigm for destruction of therapeutically intractable tumors. *Gene Ther* 1998; 5: 160-5.
- 16. Uckert W, Kammertons T, Haack K, et al. Double suicide gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells in vivo. Hum Gene Ther 1998; 9: 855-65.
- 17. Aghi M, Kramm CM, Chou TC, Breakefield XO, Chiocca EA. Synergistic anticancer effects of ganciclovir/thymidine kinase and 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapies. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 370-80.
- 18. Short MP, Choi BC, Lee JK, Malick A, Breakefield XO, Martuza RL. Gene delivery to glioma cells in rat brain by grafting of a retrovirus packaging cell line. *J Neurosci Res* 1990; 27: 427-39.
- 19. Culver K, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield E, Blaese R. *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992; 256: 1550-2.
- 20. Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann J, Klatzmann D. Regression of established macroscopic liver metastases after *in situ* transduction of a suicide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7024-8.
- 21. Ezzeddine Z, Martuza R, Platika D, *et al.* Selective killing of glioma cells in culture and *in vivo* by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *New Biol* 1991; 3: 608-14.
- 22. Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage F. Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4348-52.
- 23. Rainov NG, Dobberstein KU, Heidecke V, *et al.* Long-term survival in a rodent brain tumor model by bradykinin-enhanced intraarterial delivery of a therapeutic herpes simplex virus vector. *Cancer Gene Ther* 1998; 5: 158-62.
- 24. Vincent AJ, Vogels R, Someren GV, et al. Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy for rat malignant brain tumors. Hum Gene Ther 1996; 7: 197-205.

- 25. Wei MX, Bougnoux P, Sacre-Salem B, et al. Suicide gene therapy of chemically induced mammary tumor in rat: efficacy and distant bystander effect. Cancer Res 1998; 58: 3529-32.
- 26. Gagandeep S, Brew R, Green B, et al. Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the «bystander effect». Cancer Gene Ther 1996; 3:83-8.
- 27. Kianmanesh AR, Perrin H, Panis Y, et al. A «distant» bystander effect of suicide gene therapy: regression of nontransduced tumors together with a distant transduced tumor. Hum Gene Ther 1997; 8: 1807-14.
- 28. Namba H, Iwadate Y, Tagawa M, et al. Evaluation of the bystander effect in experimental brain tumors bearing herpes simplex virus-thymidine kinase gene by serial magnetic resonance imaging. Hum Gene Ther 1996; 7: 1847-52.
- 29. Namba H, Tagawa M, Iwadate Y, Kimura M, Sueyoshi K, Sakiyama S. Bystander effect-mediated therapy of experimental brain tumor by genetically engineered tumor cells. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 5-11.
- 30. Freeman SM, Ramesh R, Shastri M, Munshi A, Jensen AK, Marrogi AJ. The role of cytokines in mediating the bystander effect using HSV-TK xenogeneic cells. *Cancer Lett* 1995; 92: 167-74.
- 31. Ramesh R, Marrogi AJ, Munshi A, Abboud CN, Freeman SM. *In vivo* analysis of the «bystander effect»: a cytokine cascade. *Exp Hematol* 1996; 24: 829-38.
- 32. Moolten FL, Wells JM, Heyman RA, Evans RM. Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene. *Hum Gene Ther* 1990; 1:125-34.
- 33. Klatzmann D. New haematopoietic cells useful for treating *graft-versus-host* disease contain genetic sequences whose expression product reacts with pharmacologically active substances *e.g.* aciclovir or ganciclovir. *Patent 9113430*, 1991.
- 34. Cohen JL, Boyer O, Klatzmann D. Would suicide gene therapy solve the T-cell dilemma of allogeneic bone marrow transplantation? *Immunol Today* 1999; 20: 172-6.
- 35. Cohen JL, Boyer O, Salomon B, *et al.* Prevention of graft-versus-host disease in mice using a suicide gene expressed in T lymphocytes. *Blood* 1997; 89: 4636-45.
- 36. Helene M, Lake-Bullock V, Bryson JS, Jennings CD, Kaplan AM. Inhibition of graft-versus-host disease. Use of a T cell-controlled suicide gene. *J Immunol* 1997; 158:5079-82.
- 37. Ram Z, Culver K, Walbridge S, Franck J, Blaese R, Oldfield E. Toxicity studies of retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors. *J Neurosurg* 1993; 79: 400-7.

- 38. Goodman JC, Trask TW, Chen SH, *et al.* Adenoviral-mediated thymidine kinase gene transfer into the primate brain followed by systemic ganciclovir: pathologic, radiologic, and molecular studies. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 1241-50.
- 39. Smith JG, Raper SE, Wheeldon EB, et al. Intracranial administration of adenovirus expressing HSV-TK in combination with ganciclovir produces a dose-dependent, self-limiting inflammatory response. Hum Gene Ther 1997; 8: 943-54.
- 40. Brand K, Arnold W, Bartels T, et al. Liver-associated toxicity of the HSV-tk/GCV approach and adenoviral vectors. Cancer Gene Ther 1997; 4: 9-16.
- 41. Van der Eb MM, Cramer SJ, Vergouwe Y, et al. Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gene Ther* 1998; 5: 451-8.
- 42. Anonymous. Human gene marker/therapy clinical protocols. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2805-52.
- 43. Ram Z, Culver KW, Oshiro EM, et al. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. Nat Med 1997; 3: 1354-61.
- 44. Martuza RL. Act locally, think globally. *Nat Med* 1997; 3: 1323.
- 45. Lyons RM, Forry-Schaudies S, Otto E, et al. An improved retroviral vector encoding the herpes simplex virus thymidine kinase gene increases antitumor efficacy in vivo. Cancer Gene Ther 1995; 2: 273-80.
- 46. Long Z, Li LP, Grooms T, et al. Biosafety monitoring of patients receiving intracerebral injections of murine retroviral vector producer cells. Hum Gene Ther 1998; 9: 1165-72.
- 47. Klatzmann D, et al. Gene therapy for metastatic malignant melanoma: evaluation of tolerance to intratumoral injection of cells producing recombinant retroviruses carrying the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene, to be followed by ganciclovir administration. Hum Gene Ther 1996; 7: 255-67.
- 48. Klatzmann D, et al. Gene therapy for glioblastoma in adult patients: safety and efficacy evaluation of an in situ injection of recombinant retroviruses producing cells carrying the thymidine kinase gene of the Herpes simplex type 1 virus, to be followed with the administration of ganciclovir. Hum Gene Ther 1996; 7: 109-26
- 49. Klatzmann D, Valery CA, Bensimon G, et al. A phase I/II study of herpes simplex virus type I thymidine kinase «suicide» gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. Hum Gene Ther 1998; 9: 2595-604.
- 50. Klatzmann D, Cherin P, Bensimon G, *et al.* A phase I/II dose-escalation study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase «suicide» gene therapy for metasta-

- tic melanoma. Study Group on Gene Therapy of Metastatic Melanoma. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2585-94.
- 51. Galili U. Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* 1993; 14: 480-2.
- 52. Patience C, Takeuchi Y, Cosset FL, Weiss RA. Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells. *J Virol* 1998; 72: 2671-6.
- 53. Russell DW, Berger MS, Miller AD. The effects of human serum and cerebrospinal fluid on retroviral vectors and packaging cell lines. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 635-41.
- 54. Sterman DH, Treat J, Litzky LA, et al. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. Hum Gene Ther 1998; 9: 1083-92.
- 55. Eck SL, Alavi JB, Alavi A, *et al.* Treatment of advanced CNS malignancies with the recombinant adenovirus H5.010RSVTK: a phase I trial. *Hum Gene Ther* 1996; 7:1465-82.
- 56. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, *et al. HSV-TK* gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997; 276: 1719-24.
- 57. Tiberghien P, Cahn JY, Brion A, et al. Use of donor T-lymphocytes expressing herpes-simplex thymidine kinase in allogeneic bone marrow transplantation: a phase I-II study. Hum Gene Ther 1997; 8: 615-24.



Vous voulez faire un DEA, une thèse ? Vous cherchez un laboratoire de recherche ?

Vous êtes inquiet pour votre statut et votre avenir dans la recherche?

#### Vous êtes inquiet sur les débouchés dans la recherche ? BioDocs vous invite

à consulter le serveur web (Internet) http://157.136.20.60 Contactez-nous également par e-mail (analenn@pasteur.fr)

## **Summary**

## Suicide gene-based anti-cancer gene therapy: from the gene to clinical trials

Suicide genes encode enzymes that are capable of converting a non toxic prodrug into toxic metabolites. The Herpes simplex type 1 thymidine kinase and the prodrug ganciclovir which it phosphorylates define the prototypic suicide gene system endowed with interesting properties for a clinical use, notably for cancer treatment. Toxicity is due to DNA elongation impairment by triphosphorylated ganciclovir, providing specificity for dividing cells; there exists a major bystander effect by which untransduced dividing cells are killed together with transduced dividing cells during ganciclovir treatment, providing efficacy; the toxicity is doubly conditional, depending on both transgene expression and ganciclovir administration, providing safety. This system has been successfully used for treating many experimental tumors transduced by either retroviral or adenoviral vectors. These experiments have revealed that there also exists in vivo an important bystander effect which acts not only intratumorally, but also at a distance. Tumors in which less than 10% of the cells have been transduced with HSV1-TK are often eradicated by ganciclovir treatment. In addition, tumors located at a distance with no contact with these treated tumors are also dramatically affected. This bystander effect is a key element for treatment efficacy, and is in large part immune-mediated. Indeed, treated and untreated tumor are infiltrated by cells of the immune system, and the bystander effect is much reduced in immunocompromised animals. Many clinical trials have been undertaken using this system. From the published data, it appears that the treatment is most often very well tolerated. In addition, there are preliminary indications for a potential efficacy that will have to be confirmed in larger trials including control groups. Altogether, these results warrant the development of this therapeutic strategy for the treatment of cancer. There are numerous possibilities for ameliorating treatment efficacy, notably through the improvement of gene transfer and a better understanding of the molecular mechanisms of the bystander effect. We thus believe that suicide gene therapy may become an efficient anticancer treatment in coming years.

634 m/s n° 5, vol. 15, mai 99