

Transfert de gène de chimiorésistance dans les cellules souches hématopoïétiques : promesses et controverses

**Jean-Pascal Machiels
Véronique D'Hondt**

La principale limitation à l'administration de chimiothérapie à haute dose est sa toxicité hématologique. Récemment, l'étude des mécanismes de résistance à la chimiothérapie des cellules tumorales a permis d'identifier les gènes codant pour les protéines impliquées dans ces phénomènes. Ces gènes de résistance peuvent être transférés dans les cellules souches hématopoïétiques, afin de limiter l'héματο-toxicité des cytostatiques, grâce aux techniques de thérapie génique. Cela vise à permettre d'administrer de hautes doses de chimiothérapie pour un meilleur effet antitumoral. En outre, la sélection *in vivo* des cellules génétiquement modifiées par l'administration de chimiothérapie devrait augmenter l'efficacité du transfert de gène. Les modèles murins ont montré la faisabilité de cette approche. L'application clinique de cette option thérapeutique requiert encore des progrès tant dans le domaine de la construction des vecteurs que des conditions nécessaires au transfert de gène.

Les récents développements de la chimiothérapie ont révolutionné le traitement du cancer. Son intégration dans une stratégie pluridisciplinaire comprenant la chirurgie, la radiothérapie et l'immunothérapie conduit à d'importants succès dans les hémopathies malignes, le cancer du sein, les tumeurs germinales, le carcinome ovarien et le cancer coloproctal. Les progrès reposeront vraisemblablement sur une meilleure utilisation des drogues connues autant

que sur l'acquisition de nouveaux agents cytotoxiques et le développement de nouveaux moyens thérapeutiques ciblés au niveau moléculaire. Bien que ne faisant pas l'unanimité, l'augmentation des posologies mérite d'être testée en clinique car, pour de nombreux cytotoxiques, une corrélation dose-réponse a été observée, tant *in vitro* que chez l'animal. C'est principalement la toxicité hématologique qui limite la posologie. Aujourd'hui, l'administration de facteurs de croissance hématopoïétiques

ADRESSE

J.P. Machiels*, V. D'Hondt: Laboratoire d'oncologie et d'hématologie expérimentales, Université catholique de Louvain, avenue Hippocrate, 54, UCL 5471, 1200 Bruxelles, Belgique.

* Soutenu par une bourse FNRS-Télévie.

(FCH) comme le G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) et la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) autologues permettent de pallier partiellement cette myélotoxicité. La supériorité de la chimiothérapie intensive sur la chimiothérapie à dose conventionnelle est confirmée par des études randomisées dans le cadre du lymphome non hodgkinien en rechute chimiosensible [1], de la leucémie myéloblastique aiguë [2], du myélome multiple [3] et, peut-être, dans le cancer du sein de mauvais pronostic, pour lequel un recul plus long est nécessaire [4], et les tumeurs germinales. Néanmoins, l'utilisation des FCH et la greffe sont deux techniques insuffisantes car incapables de réduire la profondeur du nadir des neutrophiles et des plaquettes même si leur durée en est réduite. Les FCH myélostimulants réduisent la fréquence des épisodes fébriles et la durée d'hospitalisation mais n'allongent pas la survie des patients. Ils ne protègent qu'une seule lignée hématopoïétique. La greffe de cellules hématopoïétiques permet l'administration de chimiothérapie avec une dose au maximum triple par rapport à la dose conventionnelle. Mais, suite à un épuisement médullaire, l'utilisation de chimiothérapie conventionnelle reste difficile après chimiothérapie intensive et la dose-intensité n'est finalement que modestement majorée. L'étude des mécanismes de chimiorésistance des cellules tumorales a permis l'identification des gènes codant pour les protéines impliquées dans ces phénomènes. La chimiorésistance des cellules tumorales relève de multiples facteurs: transporteurs transmembranaires, enzymes modifiant le métabolisme des cytotoxiques ou les inactivant ou encore modification de la cible intracellulaire à l'agent cytotoxique. Les gènes de chimiorésistance clonés, l'étape suivante fut leur transfert dans les cellules souches hématopoïétiques afin de tester si cela permet une protection des lignées hématopoïétiques suffisante pour permettre l'administration de doses plus élevées et supposées plus efficaces. A l'inverse des FCH et de la greffe de CSH la surexpression d'un gène de chimiorésistance par les cellules hématopoïétiques mûres et immatures vise à

réduire la profondeur du nadir et à protéger les trois lignées hématopoïétiques (myéloïde, érythroïde et plaquettaire). De plus, des données expérimentales suggèrent que cette approche diminuerait les complications hématologiques à long terme de la chimiothérapie (myélodysplasie, hémopathies secondaires). Les applications du transfert de gène de chimiorésistance dépassent le domaine de la chimioprotection. De manière générale, le défi du transfert de gène dans les CSH est d'obtenir un taux de transfert suffisamment élevé. Avec les techniques actuelles, une expression suffisante nécessite la sélection des cellules exprimant le transgène thérapeutique. Les cellules hématopoïétiques exprimant un gène de chimiorésistance peuvent être sélectionnées *in vitro* ou *in vivo* par chimiothérapie. Si un autre gène thérapeutique (adénosine désaminase) est incorporé dans le vecteur véhiculant un gène de chimiorésistance, l'administration du cytostatique adéquat devrait permettre de sélectionner les cellules exprimant le gène de sélection et par la même occasion le transgène thérapeutique. Cela pourrait compenser, au moins

partiellement, la faible efficacité du transfert de gène dans les CSH humaines. Les vecteurs rétroviraux restent les plus utilisés pour transférer des gènes dans les cellules hématopoïétiques. Ils permettent l'intégration stable du transgène dans le génome, indispensable pour transmettre la chimiorésistance aux cellules filles. Ils sont le plus souvent dérivés du virus de la leucémie murine de Moloney (Mo-MuLV). Les gènes nécessaires à la réplication du rétrovirus sauvage sont remplacés, dans le vecteur, par l'ADN complémentaire (ADNc) du gène à transférer. Ce dernier est placé sous le contrôle d'un promoteur, le plus souvent viral (LTR du rétrovirus ou promoteur CMV ou SV40) ou parfois eucaryote (phosphoglycérate-kinase). Les vecteurs sont transfectés dans des lignées d'encapsulation qui contiennent les gènes nécessaires à la formation de particules virales et complètent *in trans* le vecteur défectueux pour la réplication. Les cellules, alors appelées « productrices », synthétisent des particules rétrovirales, incapables de se répliquer, qui véhiculent le transgène. Les

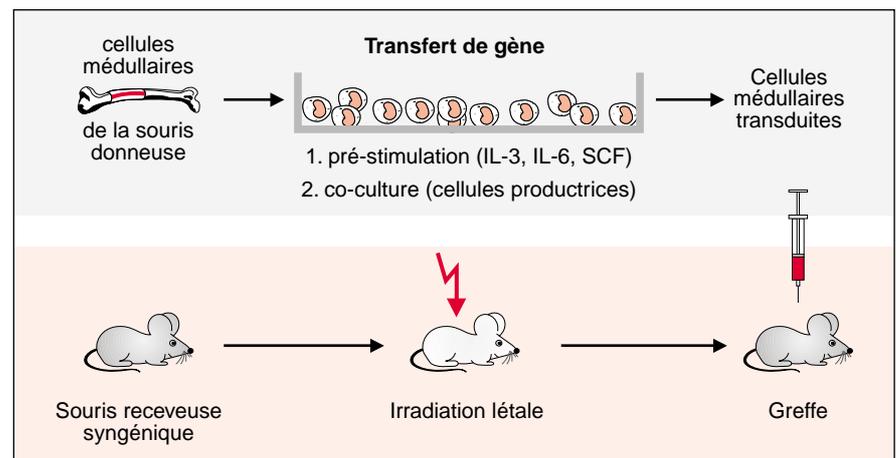


Figure 1. **Modèle animal de protection des cellules hématopoïétiques par transfert de gène de chimiorésistance.** Les cellules médullaires d'une souris donneuse sont prélevées, incubées durant 48 heures en présence de cytokines afin de les mettre en cycle puis co-cultivées durant 48 heures avec les cellules productrices de rétrovirus recombinant contenant le gène de chimiorésistance. Les cellules ainsi transduites sont injectées, par voie intraveineuse, à une souris receveuse, syngénique, préalablement irradiée létalement. Des prélèvements de sang, rate et moelle (après sacrifice) chez la souris greffée permettent d'analyser l'efficacité du transfert de gène. L'administration de chimiothérapie en postgreffe, à dose non létale, permet d'analyser si les cellules transduites sont sélectionnées (enrichies) *in vivo* par cet agent.

cellules souches hématopoïétiques sont infectées par les rétrovirus défectifs *in vitro* et ensuite greffées à un animal ou à un patient après radiothérapie ou chimiothérapie intensive myéloablatives.

Modèles précliniques de chimioprotection des cellules hématopoïétiques

En 1983, la découverte d'un gène muté de la dihydrofolate réductase (DHFR) murine conférant une résistance au méthotrexate [5] ainsi que la mise au point des techniques de transfert de gène par les rétrovirus [6] ont rendu ces expérimentations possibles. Depuis lors de nombreux modèles précliniques ont été testés avec différents gènes de chimiorésistance.

Dihydrofolate réductase et résistance aux antifolates

La dihydrofolate réductase réduit le dihydrofolate en tétrahydrofolate, substrat indispensable à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Les cytotoxiques de la classe des antifolates, le méthotrexate et le triméthotrexate, se lient à la DHFR, l'inhibent et empêchent ainsi la synthèse d'ADN. Certaines mutations de la DHFR empêchent la fixation des antifolates.

La première génération de variants de la DHFR, transduits dans les cellules hématopoïétiques, ont permis une réduction de la toxicité médullaire des antifolates [7], en empêchant la fixation du méthotrexate mais leur effet protecteur reste limité car ils inhibent également la synthèse de tétrahydrofolate indispensable à la synthèse des nucléotides.

Le variant idéal ne lierait pas le méthotrexate mais garderait un site catalytique capable de réduire le dihydrofolate en tétrahydrofolate. D'autres variants ont donc été construits qui protègent mieux les cellules hématopoïétiques chez la souris [8] et permettent de sélectionner les cellules hématopoïétiques humaines CD34⁺ dans lesquelles ils sont transférés *in vitro* [9].

La sélection *in vivo* des cellules hématopoïétiques transduites exprimant un variant de la DHFR après

transfert rétroviral n'a pu être obtenue de façon reproductible.

La limite essentielle du modèle de chimioprotection des CSH vis-à-vis des antifolates réside dans le choix du gène de résistance: l'utilisation des antifolates en clinique est tout autant limitée par leur toxicité rénale et muqueuse que par leur toxicité hématologique. La seule protection des CSH ne permettra donc guère de majorer les doses.

MDR1 (multidrug resistance gene 1)

MDR1, le gène codant pour la P-glycoprotéine (P-gp) fait partie de la superfamille des *ATP binding cassette* (transporteurs ABC). P-gp est une protéine transmembranaire comportant un site intracellulaire liant l'ATP. Sa fonction principale est d'expulser de la cellule des substances toxiques endogènes et exogènes [10].

MDR1 est impliqué dans les mécanismes de chimiorésistance. Les cellules qui l'expriment fortement résistent à un grand nombre d'agents cytotoxiques tels que les taxanes, les anthracyclines, les alcaloïdes de la pervenche, les épipodophylotoxines, l'actinomycine D et la mitomycine C [11]. Les CSH expriment faiblement P-gp [12] ce qui participe à expliquer leur résistance naturelle à la chimiothérapie. Les CSH plus mûres perdent l'expression de P-gp, d'où leur grande sensibilité à la chimiothérapie. Le modèle de souris transgéniques MDR-1 a démontré la possibilité d'accroître la chimioprotection des CSH qui surexpriment P-gp [13]. Les souris, préalablement irradiées, greffées avec des cellules médullaires transduites avec des rétrovirus contenant MDR1 présentent une neutropénie moins sévère après injection de paclitaxel (Taxol®) [14]. L'administration de paclitaxel permet de sélectionner les cellules hématopoïétiques exprimant le transgène MDR1, ce qui accroît la chimioprotection lors de la deuxième cure. Ce mécanisme de sélection *in vivo* peut être utilisé pour augmenter le pourcentage de cellules exprimant un autre transgène thérapeutique, qui serait transféré dans le même vecteur. Différentes stratégies sont utilisées pour construire des vecteurs rétroviraux capables de véhiculer deux ADNc dif-

férents. Les vecteurs dans lesquels les deux gènes sont sous la dépendance de promoteurs différents surexpriment souvent le gène utilisé pour la sélection par rapport au gène thérapeutique associé, qui s'éteint progressivement. Ce déséquilibre semble moins fréquent quand les deux gènes sont séparés par un *internal ribosomal entry site* (IRES). Plusieurs vecteurs co-exprimant un gène d'intérêt (adénosine déaminase, glucocérobrosidase humaine, α -galactosidase A, thymidine kinase du virus *Herpes simplex*) et le gène *MDR1* ont été construits. Dans ces expériences, l'administration de vincristine permet de sélectionner *in vitro* les cellules transduites et augmente l'expression non seulement du gène de sélection *MDR1* mais également du gène d'intérêt [15]. Ce procédé pourrait compenser le faible transfert de gènes dans les CSH humaines mais son efficacité reste à démontrer *in vivo*.

Les cellules CD34⁺ humaines peuvent également être transduites avec des vecteurs rétroviraux MDR1. L'efficacité du transfert de gène, évaluée par culture de progéniteurs hématopoïétiques, les CFU-GM, en milieu semisolide, varie fortement d'une étude à l'autre (2 % à 70 %). Ces progéniteurs humains sont plus résistants au paclitaxel et peuvent être sélectionnés *in vitro* [16].

Plusieurs études cliniques de phase I sont en cours (*voir plus loin*).

MRP (multidrug resistance-associated protein)

Cloné en 1992, le gène de la MRP (*multidrug resistance-associated protein*) fait partie, comme le gène *MDR1*, de la superfamille des transporteurs liant l'ATP [17]. Il code pour une protéine de 190 kDa capable d'exporter de la cellule et de séquestrer dans des vésicules intracytoplasmiques un large éventail de molécules anioniques (cystéinyl leucotriène, aflatoxine, cytostatiques, 17 β -estradiol). Les cellules qui l'expriment sont résistantes à plusieurs classes d'agents cytotoxiques: anthracyclines, alcaloïdes de la pervenche et épipodophylotoxines. [18]. La protéine MRP est exprimée très faiblement par les cellules CD34⁺ et les progéniteurs hématopoïétiques.

Le transport des différents substrats dépend du glutathion. Le déficit en glutathion rend les cellules exprimant MRP plus sensibles à la vincristine, à la doxorubicine et au VP-16. A l'inverse, l'addition de glutathion au milieu de culture facilite la sélection de fibroblastes exprimant MRP en présence de doxorubicine [19]. Son mécanisme d'action n'est pas certain : transport de substances sous forme glucoronoconjuguée et/ou mécanisme de co-transport avec le glutathion.

Ayant construit deux vecteurs rétroviraux contenant l'ADNc du gène MRP, nous avons montré leur effet chimioprotecteur après transduction de fibroblastes ainsi que la possibilité de les sélectionner *in vitro* dans un milieu contenant de la doxorubicine [19]. Nous avons également démontré que des souris transplantées avec des cellules médullaires infectées par ces rétrovirus présentent une leucopénie moins sévère après administration de doxorubicine [20] (figure 2). La chimioprotection est meilleure après la seconde cure de chimiothérapie suite à la sélection *in vivo* des cellules résistantes à la doxorubicine. Il est cependant peu probable que notre modèle puisse être utilisé comme système de sélection, avec des vecteurs rétroviraux. En effet, la grande taille de l'ADNc du gène MRP rend difficile la construction de vecteurs rétroviraux bicistroniques fonctionnels. Ce modèle de sélection serait envisageable dans un autre système viral qui permettrait l'intégration d'un matériel génétique de plus grande taille. Les souris transduites avec MRP ont une survie plus longue que celles transduites avec un vecteur de contrôle porteur du gène de résistance à la néomycine (figure 2). L'intérêt de transférer le gène MRP plutôt que *MDR1* réside dans sa modulation différente. En effet, les modulateurs de la P-gp n'ont pas ou très peu d'effet sur la protéine MRP. A l'heure actuelle, plusieurs de ces agents modulateurs sont testés en clinique pour renverser la chimiorésistance des tumeurs exprimant la P-gp. Dans ce contexte, il est difficile de protéger les cellules hématopoïétiques avec *MDR1* puisque cette chimioprotection serait renversée par les modulateurs. Le transfert de l'ADNc du gène MRP dans les cel-

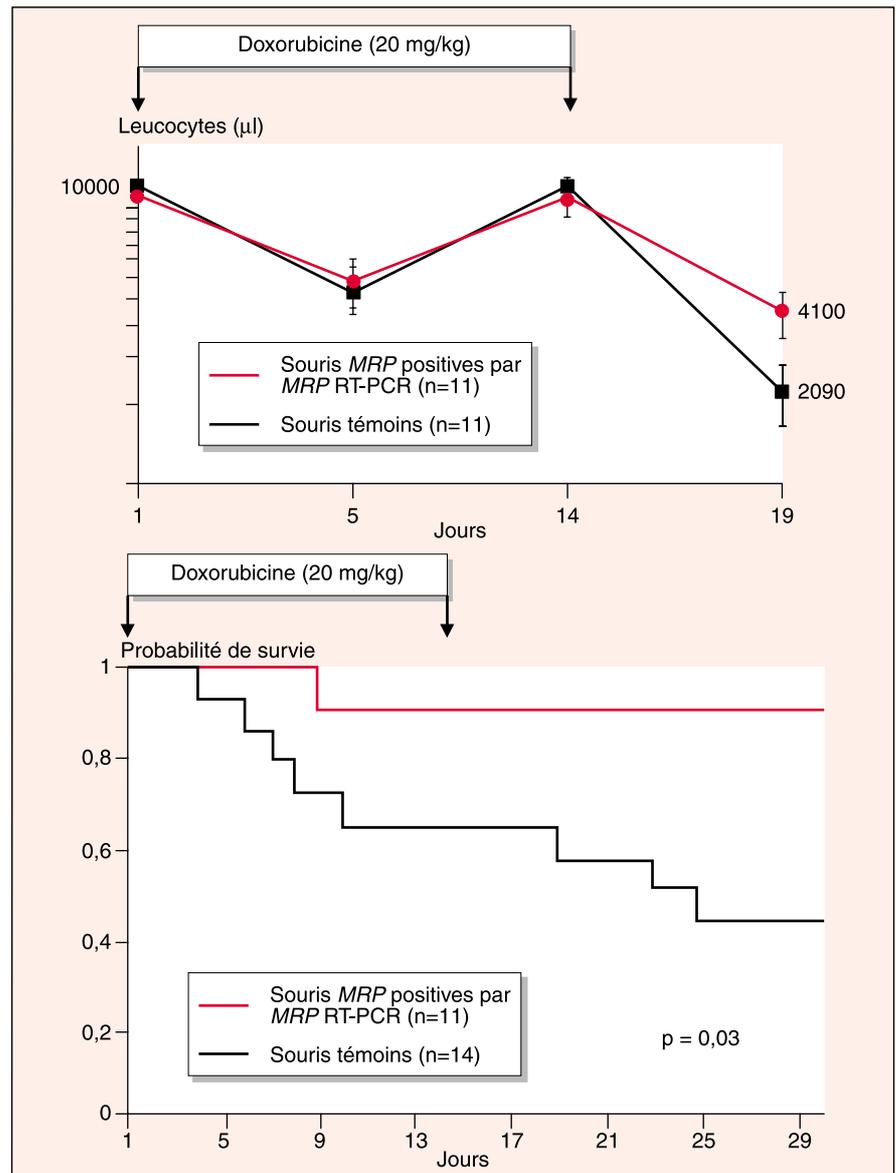


Figure 2. **Protection des cellules hématopoïétiques de souris transduites avec le gène *mrp*, sélection *in vivo* et amélioration de la survie dans le décours de la chimiothérapie.** Les souris greffées avec des cellules médullaires transduites avec MRP reçoivent deux injections de doxorubicine à 2 semaines d'intervalle. Après la seconde administration de doxorubicine, les souris dont les cellules médullaires expriment *mrp* (positives en RT-PCR avant la chimiothérapie – en rouge) ont une leucopénie moins profonde que les souris témoins (en noir). Dans le décours de la première cure, suffisamment de cellules médullaires transduites survivent à l'injection de doxorubicine et sont sélectionnées pour procurer une protection significative après la seconde cure de chimiothérapie. Les souris qui expriment *mrp* survivent mieux à la chimiothérapie postgreffe.

lules hématopoïétiques permettrait de protéger les cellules médullaires de la chimiothérapie concomitamment à l'utilisation des modulateurs de la P-gp pour rétablir la chimiosensibilité des tumeurs. Les tumeurs surexprimant *MDR1* et pas MRP

seraient donc de bonnes indications pour utiliser le gène MRP comme chimioprotecteur hématopoïétique.

Résistance aux nitroso-urées

Les nitroso-urées (bischloroéthyl-nitroso-urée [BCNU], cyclohexyl

chloroéthyl-nitroso-urées [méthyl-CCNU]) méthylient la guanine en position O⁶, forment ainsi un pont entre les deux brins d'ADN et provoquent la mort cellulaire. L'O⁶-méthyl-guanine-méthyltransférase (MGMT) peut réparer ces lésions en déméthylant les guanines (O⁶-méthyl-guanine). Des cellules transfectées avec l'ADNc de la MGMT deviennent résistantes aux nitroso-urées [21].

La toxicité limitante des nitroso-urées est hématologique. La surexpression de MGMT après transfert rétroviral dans les cellules hématopoïétiques augmente leur résistance au BCNU tant *in vitro* pour les cellules CD34⁺ humaines qu'*in vivo* chez la souris [22]. La mortalité des souris greffées avec des cellules médullaires transduites par MGMT est également moindre après administration de BCNU [23]. Il est intéressant de noter que les souris transgéniques pour MGMT ne développent pas d'hémopathie secondaire à l'administration de nitroso-urées, indiquant une réelle protection des CSH vis-à-vis de la drogue.

L'administration de BCNU sélectionne *in vivo* les cellules hématopoïétiques transduites avec des rétrovirus MGMT ce qui permet d'améliorer la chimio-protection en cours de traitement. Plusieurs caractéristiques rendent le gène *MGMT* attrayant comme système de sélection : ADNc de petite taille (0,625 kb) facilitant la construction de vecteurs rétroviraux bicistroniques, haute toxicité du BCNU sur les précurseurs hématopoïétiques et très faible expression de la MGMT dans les cellules souches. Ces deux derniers points permettent une sélection optimale en éliminant les cellules souches pluripotentes non transduites. Cependant, l'intérêt clinique de ce gène de résistance est limité par la mutagénicité de ces agents cytotoxiques. Ces vecteurs sont essentiellement intéressants comme outil de sélection.

Autres gènes de chimiorésistance

Les mécanismes de résistance à d'autres agents alkylants que les nitroso-urées, comme le cyclophosphamide, le melphalan ou la méchloréthamine sont moins connus et le transfert génique débute seulement dans ce domaine. L'aldéhyde déshy-

drogénase (ALDH) est impliquée dans la résistance au cyclophosphamide et au mafosfamide en transformant l'aldophosphamide, métabolite actif du cyclophosphamide, en carboxyphosphamide, composant non toxique. L'ALDH-1 est l'isoforme la plus puissante. Le transfert rétroviral d'ALDH-1 augmente de 2 à 3 fois la résistance au 4-hydroxy-cyclophosphamide de la lignée hématopoïétique K562. De même, des cellules CD34⁺ humaines transduites avec ALDH-1 sont résistantes au mafosfamide *in vitro* [24]. Cependant, la courte demi-vie des ARNm de l'*ALDH-1* dans les cellules transduites limite considérablement l'efficacité de ces vecteurs [25]. Comme le gène de la β -globine, l'ALDH-1 est probablement « intron-dépendant » et n'est transporté du noyau vers le cytoplasme qu'après un épissage correct. Une meilleure compréhension de ces phénomènes est nécessaire pour poursuivre les expérimentations avec *ALDH-1*.

En outre, l'expérience clinique n'étaye pas une stratégie d'hémo-protection pour le cyclophosphamide car les cellules CD34⁺ expriment fortement ce gène et sont naturellement très résistantes au cyclophosphamide (d'où la courte durée du nadir).

Une autre protéine responsable de résistance multiple à la chimiothérapie est la glutathion-transférase. Les glutathion-S-transférases sont des homo- ou hétérodimères qui conjuguent le glutathion à une grande variété de xénobiotiques afin de les éliminer. Le transfert rétroviral de la glutathion-S-transférase Yc de rat dans la lignée hématopoïétique K-562 et dans les CSH murines augmente leur résistance à la méchloréthamine et au chlorambucil *in vitro* [26]. De même, les cellules CD34⁺ humaines transduites avec la glutathion-S-transférase π sont plus résistantes à l'adriamycine et au 4-hydrocyclophosphamide [27]. Ces résultats sont prometteurs.

La cytidine-déaminase est capable d'inactiver des cytotoxiques de la classe des analogues nucléosidiques tels que la cytosine arabinoside (ARA-C). Les progéniteurs murins sont protégés *in vitro* de la toxicité de l'ARA-C après transfert rétroviral de l'ADNc de la cytidine désaminase [28]. Tout comme pour l'ALDH-1 et

les glutathion-S-transférases, il n'existe pas encore de modèle préclinique utilisant la cytidine désaminase *in vivo*.

Des vecteurs rétroviraux contenant deux gènes de résistance à la chimiothérapie ont été construits afin d'élargir le spectre de chimiorésistance [29-31]. Par exemple, un vecteur associant MDR1 et glutathion-S-transférase π sous la dépendance de deux promoteurs différents [29] et un vecteur bicistronique véhiculant une dihydrofolate mutée et MDR1 [30] ont été montrés fonctionnels *in vitro* après transfert dans des lignées cellulaires.

Études cliniques

Plusieurs études cliniques de phase I ou II sont en cours avec le gène *MDR1* [32-34]. Les patients atteints de cancer avancé (sein, ovaire, cerveau, tumeur germinale), sans envahissement de la moelle osseuse, nécessitant une chimiothérapie intensive, sont éligibles. Les cellules souches sont prélevées par cytophèrese après chimiothérapie conventionnelle et facteurs de croissance hématopoïétiques. La fraction CD34⁺ est isolée. Dans les premières études, un tiers des cellules CD34⁺ est transduit par le vecteur rétroviral MDR1 puis congelé, les deux tiers restants étant congelés d'emblée. Après l'intensification thérapeutique, les cellules CD34⁺ sont réinjectées au patient (1/3 transduit, 2/3 non transduites). L'équipe du MD Anderson (Houston, Texas, USA) a montré que si l'efficacité d'infection mesurée par culture de CFU-GM varie entre 2 % et 20 %, le pourcentage de cellules sanguines dans lesquelles on retrouve le signal MDR1 *in vivo*, 3 à 4 semaines après la greffe, est beaucoup plus faible [34]. Des résultats similaires ont été obtenus à Columbia University (USA). Ces derniers auteurs obtiennent des taux d'infection de 20 % à 50 % *in vitro*. Chez les patients, en revanche, un signal PCR du transgène n'est détectable dans le sang que chez 2 patients sur 5 après la greffe. Les deux patients possédaient moins de 1 cellule médullaire positive sur 1 000 [33]. Cela démontre la difficulté d'un transfert efficace dans les CSH humaines et indique également que l'efficacité de transduction évaluée par culture de CFU-GM ne reflète pas celle des CSH

responsables de la reprise hématopoïétique à long terme. En effet, les cellules CD34⁺ représentent une large population n'incluant pas seulement les cellules totipotentes mais également des cellules plus différenciées. En outre, les données expérimentales récentes suggérant qu'une partie des CSH n'exprime pas l'antigène CD34, invitent à reconsidérer cette question [35].

Plus récemment, l'équipe d'Indiana University (USA) a testé une nouvelle stratégie qui semble augmenter l'efficacité de la procédure [36]. Les cellules souches périphériques de patients atteints de tumeur germinale, éligibles pour une double intensification thérapeutique, sont récoltées. Une première partie de ces cellules, non manipulée, est réinjectée après la première chimiothérapie intensive; de l'autre partie, les cellules CD34⁺ sont isolées, transduites et réinjectées après la deuxième chimiothérapie intensive (figure 3). Les auteurs détectent la présence du transgène MDR1 chez tous les patients, dans le sang à deux semaines de la greffe et dans la moelle à un mois de la greffe. Cette efficacité de transfert de gène est meilleure que celles précédemment

décrites. Peuvent en rendre compte: (1) l'injection exclusive de cellules transduites lors de la 2^e greffe, sans compétition de ce fait avec des cellules non manipulées (qui ont peut-être un avantage pour repeupler la moelle par rapport aux cellules manipulées comme les études de repopulation chez la souris, après myélosuppression partielle le suggèrent [37]); (2) les conditions de transduction *ex vivo*; (3) le régime d'intensification.

La situation clinique idéale pour un transfert de gène pourrait être une intensification suivie de greffe des seules cellules transduites et l'administration en postgreffe, de chimiothérapie conventionnelle qui permette la sélection *in vivo* des cellules transduites.

La reprise hématopoïétique après greffe de cellules CD34⁺ transduites avec les rétrovirus MDR1 est similaire à celle de cellules CD34⁺ non génétiquement modifiées et la procédure n'est pas toxique [36, 38].

Obstacles aux applications cliniques

Le retard d'utilisation du transfert de gène de chimiorésistance en clinique est lié à des obstacles techniques: (a)

le risque d'introduire un gène de chimiorésistance dans des cellules tumorales contaminant le greffon hématopoïétique; (b) la toxicité non hématologique de la chimiothérapie; et (c) la faible efficacité du transfert de gène dans les cellules souches hématopoïétiques humaines.

Contamination du greffon hématopoïétique

Les prélèvements de cellules souches périphériques peuvent être contaminés par des cellules tumorales provenant de la moelle osseuse. En outre, les facteurs de croissance utilisés pour mobiliser les CSH de la moelle vers le sang pourraient mobiliser également des cellules tumorales [39]. L'histologie conventionnelle ne permet pas toujours de détecter des cellules tumorales contaminantes dans des échantillons de moelle. Le transfert de gène pourrait donc transférer un gène de chimiorésistance dans les cellules tumorales contaminantes, ce qui risque d'entraîner des rechutes réfractaires à la chimiothérapie.

La sélection positive des CD34⁺ réduit de 10 à 1000 fois la contamination tumorale du greffon mais ne l'élimine pas complètement. Une approche complémentaire serait de cibler le transfert de gène dans les CSH grâce à des rétrovirus modifiés portant en surface une protéine reconnaissant spécifiquement un antigène à la surface des cellules hématopoïétiques. Ainsi, l'incorporation du gène de l'érythropoïétine (EPO) dans le gène codant pour l'enveloppe des rétrovirus qui portent alors des protéines d'enveloppe mixtes, a permis une transduction spécifique des cellules hématopoïétiques exprimant le récepteur de l'EPO [40]. Toutefois, ces résultats n'ont pu être reproduits avec la même efficacité par d'autres équipes et l'antigène idéal pour cibler les cellules souches totipotentes doit encore être identifié.

L'addition d'un gène suicide dans le vecteur contenant le gène de chimiorésistance, permettrait de détruire les cellules transduites par administration d'un précurseur pharmacologique. Un vecteur rétroviral bicistronique véhiculant l'ADNc de MDR1 et de la thymidine kinase du virus herpes (HSV-TK) utilisé chez la souris a

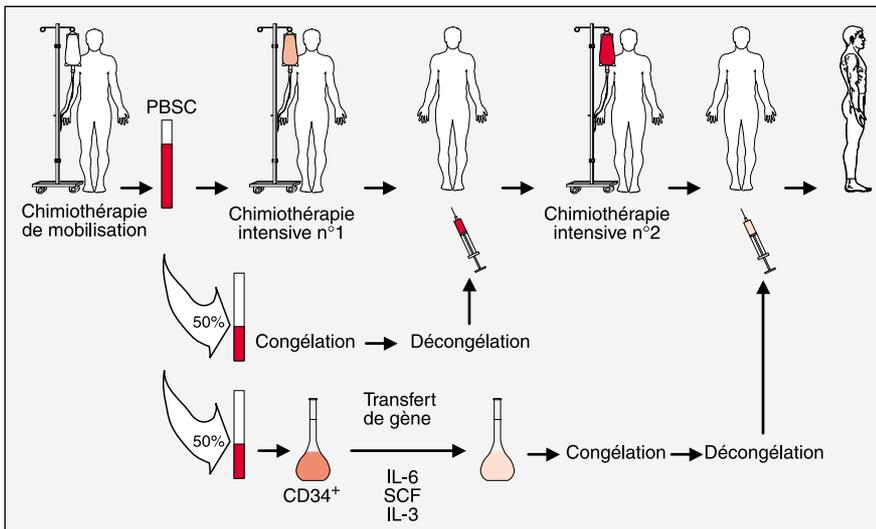


Figure 3. **Schéma du protocole clinique de transfert de gène dans les CSH à l'Université d'Indiana [40].** Les patients atteints de tumeur germinale reçoivent chimiothérapie et cytokines afin de récolter les cellules souches périphériques. La première chimiothérapie intensive est suivie de la greffe de cellules non modifiées. La deuxième chimiothérapie intensive est suivie de la greffe de cellules CD34⁺ dans lesquelles le gène de résistance MDR1 a été transféré. L'analyse des cellules médullaires et sanguines du sujet greffé permet d'évaluer l'efficacité du transfert de gène.

permis de détruire les cellules transduites, à la fois les cellules hématopoïétiques et les cellules tumorales, par administration de ganciclovir. [41]. Reste à démontrer que ce système permet d'éliminer *in vivo* les cellules tumorales accidentellement transduites et réinjectées. Dans la même optique, un vecteur combinant un gène de chimiorésistance (*DHFR*) et un antisens anti-BCR/ABL a été construit [42] afin de transférer un gène de résistance à la chimiothérapie en cas de contamination tumorale connue, la leucémie myéloïde chronique. Les souris atteintes sont greffées avec les CSH transduites et reçoivent du méthotrexate après la greffe pour consolider le résultat antitumoral. Les cellules hématopoïétiques malignes accidentellement transduites, porteuses de l'oncogène BCR/ABL, devraient perdre leur malignité grâce à l'antisens anti-BCR/ABL. L'efficacité de cette construction a été démontrée *in vitro* et dans un modèle murin.

Cependant, les techniques actuelles de détection des cellules tumorales ne sont pas suffisamment sensibles pour tenter le transfert de gène de chimiorésistance dans d'autres situations cliniques que les tumeurs solides sans envahissement médullaire détectable par les techniques les plus sensibles à savoir l'immunohistochimie et la RT-PCR.

La toxicité non hématologique de la chimiothérapie

La chimioprotection des CSH sera surtout bénéfique si seule la myélosuppression limite l'escalade des doses. Les indications du transfert de gène de chimiorésistance devront tenir compte du rapport coût/bénéfice associé à l'escalade des doses. Les alkylants (cyclophosphamide, nitroso-urées), les taxanes (paclitaxel, docetaxel), bons candidats, peuvent avoir des toxicités extra-hématologiques sévères à forte dose. L'administration de fortes doses de méthotrexate est limitée par ses toxicités muqueuse et rénale. La doxorubicine provoque une cardiomyopathie, chez l'homme, lorsque des doses cumulatives supérieures à 550 mg/m² sont atteintes. Cette toxicité

cardiaque ne permet pas de majorer de façon importante les doses administrables mais la protection des CSH pourrait permettre de réduire l'intervalle entre les cures. De cette façon, la dose-intensité, à savoir, la dose administrée dans un intervalle de temps, peut néanmoins être majorée. La dose-intensité est mieux corrélée au pronostic du cancer que la dose elle-même. Nous avons montré dans un modèle murin que protéger les CSH par transfert rétroviral du gène *MRP* permet d'administrer de plus hautes doses de doxorubicine dans le même intervalle de temps [20].

Faible efficacité du transfert de gène dans les cellules souches hématopoïétiques humaines

Le faible taux de transduction des CSH par les vecteurs rétroviraux limite considérablement le transfert de gène en clinique. Certaines maladies génétiques comme le déficit en adénosine désaminase ne requièrent qu'un faible taux de transduction des cellules pour observer une amélioration clinique. En revanche, certaines maladies métaboliques et les hémoglobinoopathies requièrent la transduction de nombreuses cellules hématopoïétiques et l'expression à long terme du transgène. Il en va de même pour le transfert de gène de chimiorésistance. Or, les premières études cliniques avec *MDR1* ont souligné la difficulté de transduire efficacement et à long terme les cellules hématopoïétiques pluripotentes humaines. Des résultats similaires ont été obtenus dans les protocoles de transfert de gènes marqueurs où les taux de cellules transduites *in vivo* varient entre 0,01 % et 0,1 %. L'amélioration de l'efficacité du transfert de gène peut se faire de plusieurs façons :

- modifier les conditions techniques du transfert de gène lui-même :
- optimiser le cocktail de cytokines qui maintienne l'équilibre adéquat entre la mise en cycle des progéniteurs et la conservation de leur pluri-potentialité. Les *IL-1*, *IL-6*, *SCF* (*stem cell factor*), *IL-11*, *Flt3* ligand (*Flt3l*) et la thrombopoïétine (*TPO*) semblent ne pas altérer la capacité des progéniteurs à reconstituer l'hématopoïèse *in vivo*;

- tester les différentes molécules qui favorisent l'adhérence cellule-vecteur, telles que le fragment 296 de la fibronectine; transduire les CSH sur milieu stromal, technique plus laborieuse, pour préserver les cellules hématopoïétiques les plus immatures ;

- identifier des promoteurs spécifiques permettant une expression élevée dans les CSH ;

- modifier les protéines d'enveloppe des rétrovirus pour faciliter l'interaction avec les cellules cibles.

- modifier le protocole de greffe pour repeupler la moelle : les cellules transduites ont peut-être un désavantage fonctionnel, comparativement aux cellules non manipulées. La greffe des seules cellules transduites après intensification permettrait d'éviter la compétition. En outre, la sélection par administration de chimiothérapie conventionnelle après la greffe devrait être intégrée dans les protocoles cliniques.

Des progrès décisifs nécessiteront la mise au point d'autres systèmes, viraux ou non, de transfert de gènes. Récemment, des lentivirus dérivés du virus d'immunodéficience humaine (*VIH*) ont été utilisés pour transduire des cellules *CD34+*. Ces vecteurs permettent de transduire des cellules quiescentes et ne requièrent donc pas l'addition de cytokines qui induisent à la fois une différenciation cellulaire et une stimulation de la division cellulaire. Ils ont en outre été modifiés pour exprimer la glycoprotéine d'enveloppe *G* du virus de la stomatite vésiculaire (pseudotype *VSV-G*), ce qui permet un large spectre d'infectivité et facilite la concentration par centrifugation pour augmenter le titre viral d'infection. Des cellules *CD34+* du sang de cordon, transduites grâce à ces vecteurs, repeuplent le système hématopoïétique de souris *NOD/SCID* irradiées. Vingt-deux semaines après la greffe, on retrouve le marqueur (la protéine à fluorescence verte *GFP*) dans 5 % à 15 % des cellules hématopoïétiques du sang périphérique, alors que le marqueur n'est pas détectable chez les souris dont les cellules *CD34+* ont été transduites avec les vecteurs dérivés du rétrovirus de Moloney [43].

On peut espérer une meilleure efficacité thérapeutique lorsque ces nou-

veaux vecteurs viraux ou des systèmes de transduction physico-chimiques seront au point pour l'application clinique.

Conclusions

La myélotoxicité de la chimiothérapie demeure un problème important en oncologie. La thérapie génique par transfert de gène de chimiorésistance dans les CSH offre une perspective intéressante, dont la faisabilité et le bénéfice potentiel ont été démontrés dans des modèles murins. L'extrapolation de ces résultats à l'homme est problématique principalement en raison de la faible efficacité du transfert de gène dans les CSH humaines et du risque de transduction de cellules tumorales contaminant le greffon hématopoïétique. La sélection *in vivo* par la chimiothérapie des cellules exprimant le transgène pourrait améliorer le rendement de la transduction. Le perfectionnement des techniques de transfert de gènes établira si ces nouvelles thérapies améliorent le pronostic des patients cancéreux ■

RÉFÉRENCES

- Philip T, Gugliemi C, Hagenbeek A, *et al*. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1995; 333: 1540-5.
- Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, *et al*. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European organization for research and treatment of cancer (EORTC) and the gruppo italiano ematologiche maligne dell'adulto (GIMEMA) leukemia cooperative groups. *N Engl J Med* 1995; 332: 217-23.
- Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, *et al*. Consolidation treatment of adult lymphoblastic leukemia: a prospective, randomized trial comparing allogeneic versus autologous bone marrow transplantation and testing the impact of recombinant interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation. BGMT Group. *Blood* 1995; 86: 1619-28.
- Bezuda WR, Seymour L, Dansey RD. High dose chemotherapy with hematopoietic rescue as primary treatment for metastatic breast cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2483-9.
- Simonsen CC, Levinson AD. Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2495-9.
- Mann R, Mulligan RC, Baltimore D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 1983; 33: 153-9.
- Hock RA, Miller AD. Retrovirus-mediated transfer and expression of drug resistance genes in human progenitor cells. *Nature* 1986; 320: 275-7.
- Lewis WS, Cody V, Galistky N, Luft JR, Pangborn W, Chunduru SK, Spencer HT, Appleman JR, Blakley RL. Methotrexate-resistant variants of human dihydrofolate reductase with substitutions of leucine 22. Kinetics, crystallography, and potential as selectable markers. *J Biol Chem* 1995; 270: 5057-64.
- Flashove M, Banerjee D, Mineishi S, Li MX, Bertino JR, Moore MA. *Ex vivo* expansion and selection of human CD34⁺ peripheral blood progenitor cells after introduction of a mutated dihydrofolate reductase cDNA *via* retroviral gene transfer. *Blood* 1995; 85: 566-74.
- Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 1986; 47: 371-??.
- Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human «MDR1» gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3004-8.
- Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991; 66: 85-94.
- Galski H, Sullivan M, Willingham MC, Gottesman MM, Pastan I, Merlino GT. Expression of a multidrug-resistance cDNA (MDR1) in the bone marrow of transgenic mice: resistance to daunomycin-induced leukopenia. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 4357-63.
- Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, *et al*. Selection of drug resistant BM cells *in vivo* after retroviral transfer of human MDR1. *Science* 1992; 257: 99-103.
- Aran JM, Gottesman MM, Pastan I. Drug-selected coexpression of human glucocorticoid and P-glycoprotein using a bicistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3176-80.
- Ward M, Pioli P, Ayello J, *et al*. Retroviral transfer and expression of the human multiple drug resistance (MDR) gene in peripheral blood progenitor cells. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 873-6.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, *et al*. Overexpression of a transporter gene in a multidrug resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258: 1650-4.
- Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 1994; 54: 5902-10.
- D'Hondt V, Caruso M, Bank A. Retrovirus-mediated gene transfer of the multidrug resistance-associated protein (MRP) cDNA protects cells from chemotherapeutic agents. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1745-51.
- Machiels JP, Govaerts AS, Guillaume T, *et al*. Retroviral mediated gene transfer of the multidrug resistance-associated protein into murine hematopoietic cells protects mice from chemotherapy induced-leucopenia. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 801-11.
- Kaina B, Fritz G, Mitra S, Coquerelle T. Transfection and expression of human O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1857-67.
- Allay JA, Dumenco LL, Koc ON, Liu L, Gerson SL. Retroviral transduction and expression of the human alkyltransferase cDNA provides nitrosourea resistance to hematopoietic cells. *Blood* 1995; 85: 3342-51.
- Maze R, Carney JP, Kelley MR, Glassner BJ, Williams DA, Samson L. Increasing DNA repair methyl transferase levels *via* bone marrow stem cell transduction rescues mice from the toxic effects of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, a chemotherapeutic alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 206-10.
- Magni M, Shammah S, Schiro R, Mellado W, Dalla-Favera R, Gianni AM. Induction of cyclophosphamide-resistance by aldehyde-dehydrogenase gene transfer. *Blood* 1996; 87: 1097-103.
- Bunting KD, Webb M, Giorgianni G, *et al*. Coding region-specific destabilization of mRNA transcripts attenuates expression from retroviral vectors containing class I aldehyde dehydrogenase cDNAs. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1531-43.
- Létourneau S, Greenbaum M, Cournoyer D. Retrovirus-mediated gene transfer of rat glutathione-S-transferase Yc confers *in vitro* resistance to alkylating agents in human leukemia cells and in clonogenic mouse hematopoietic progenitor cells. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 831-40.
- Kuga T, Sakamaki S, Matsunaga T, *et al*. Fibronectin fragment-facilitated retroviral transfer of the glutathione-S-transferase π gene into CD34⁺ cells to protect them against alkylating agents. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1901-10.
- Mompalmer RL, Eliopoulos N, Bovenzi V, Létourneau S, Greenbaum M, Cournoyer D. Resistance to cytarabine by retrovirally mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblasts and hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther* 1996; 3: 331-8.
- Doroshov JH, Metz MZ, Matsumoto, *et al*. Transduction of NIH 3T3 cells with a retrovirus carrying both human MDR1 and glutathione-S-transferase π produces broad-range multidrug resistance. *Cancer Res* 1995; 55: 4073-8.

RÉFÉRENCES

30. Galipeau J, Benaim E, Spencer HT, Blakley RL, Sorrentino BP. A bicistronic retroviral vector for protecting hematopoietic cells against antifolates and P-glycoprotein effluxed drugs. *Hum Gene Ther* 1997; 8 : 1773-83.
31. Beauséjour CM, Oanh Le NL, Létourneau S, Cournoyer D, Mompalmer R. Coexpression of cytidine deaminase and mutant dihydrofolate reductase by a bicistronic retroviral vector confers resistance to cytosine arabinoside and methotrexate. *Hum Gene Ther* 1998; 9 : 2537-44.
32. O'Shaughnessy JA, Cowan KH, Nienhuis AW, *et al.* Retroviral mediated transfer of the human multidrug resistance gene (MDR-1) into hematopoietic stem cells during autologous transplantation after intensive chemotherapy for metastatic breast cancer. *Hum Gene Ther* 1994; 5 : 891-911.
33. Hesdorffer C, Ayello J, Ward M, *et al.* Phase I trial of retroviral-mediated transfer of the human MDR1 gene as marrow chemoprotection in patients undergoing high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 1998; 16 : 165-72.
34. Hanania EG, Giles RE, Kavanagh J, *et al.* Results of MDR-1 vector modification trial indicate that granulocyte/macrophage colony-forming unit cells do not contribute to posttransplantation hematopoietic recovery following intensive systemic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 : 15346-51.
35. Goodef MA, Rosenzweig M, Kim H, *et al.* Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cell expressing low or undetectable levels of CD34 exist in multiple species. *Nat Med* 1997; 3 : 1337-45.
36. Abonour R, Einhorn L, Hromas R, *et al.* Highly efficient MDR1 gene transfer into humans using mobilized CD34⁺ cells transduced over recombinant fibronectin CH-296 fragment. *Blood* 1998; 92 (suppl 1) : 690.
37. Kittler EL, Peters SO, Crittenden RB, *et al.* Cytokine-facilitated transduction leads to low level engraftment in nonablated hosts. *Blood* 1997; 90 : 865-72.
38. Devereux S, Corney C, Macdonald C, *et al.* Feasibility of multidrug resistance (MDR-1) gene transfer in patients undergoing high-dose therapy and peripheral blood stem cell transplantation for lymphoma. *Cancer Gene Ther* 1998; 5 : 403-8.
39. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, *et al.* Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 1994; 83 : 636-40.
40. Kasahara N, Dozy AM, Kan YW. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* 1994; 266 : 1373-6.
41. Sugimoto Y, Sato S, Tsukahara S, *et al.* Coexpression of a multidrug resistance gene (MDR1) and herpes simplex virus thymidine kinase gene in a bicistronic retroviral vector Ha-MDR-IRES-TK allows selective killing of MDR1-transduced human tumors transplanted in nude mice. *Cancer Gene Ther* 1997; 4 : 51-8.
42. Zhao RC, McIvor RS, Griffin JD, Verfaillie CM. Gene therapy for chronic myelogenous leukemia (CML) : a retroviral vector that renders hematopoietic progenitors methotrexate-resistant and CML progenitors functionally normal and nontumorigenic *in vivo*. *Blood* 1997; 90 : 4687-98.
43. Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE. Transduction of human CD34⁺ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 1999; 283 : 682-6.

Summary

Chemoresistance gene transfer into hematopoietic cells : hope and pitfalls

Our better understanding of chemotherapy resistance has led to the proposal that gene therapy can protect hematopoietic stem cells from cytotoxic drugs toxicity. Transfer of drug resistance genes into hematopoietic cells may allow the administration of higher doses of chemotherapy and, thus, increase regression or even cure for chemosensitive tumors. In addition, chemoresistance genes can be used to allow *in vivo* selection of transduced cells after the administration of cytotoxic drugs. Preclinical studies using MDR1 (multidrug resistance 1), mDHFR (mutants of dihydrofolate reductase) and MGMT (methylguanine DNA methyltransferase) genes have already proven the feasibility of this approach. Our group has studied the potential value of MRP (multidrug resistance-associated protein) to protect hematopoietic cells. Phase I clinical trials are currently in progress. However the low stem-cell transduction efficiency limits the clinical applications.

TIRÉS À PART

V. D'Hondt.