

Immortalisation réversible : vers une nouvelle stratégie de thérapie cellulaire

Au sein d'un organisme, la plupart des cellules quittent le cycle cellulaire et se différencient avant d'avoir épuisé leur potentiel prolifératif. Ce n'est cependant pas le comportement qu'adoptent, en culture, la plupart des cellules somatiques de mammifères. En effet, des études menées par le groupe d'Hayflick dans les années 1960 sur le doublement des fibroblastes *in vitro* avaient déjà montré qu'il existait un nombre limité de divisions cellulaires (figure 1A), introduisant la notion de sénescence répliquative [1]. Cette perte du potentiel prolifératif et de l'aptitude des cellules à dupliquer leur ADN dans un état où elles restent viables semble être un processus génétiquement programmé. Récemment, l'érosion des extrémités chromosomiques ou télomères, correspondant à une coiffe protectrice, a été corrélée à une limitation de la capacité proliférative des cellules et donc à leur durée de vie [2]. Cette horloge télomérique aboutit à un seuil, reconnu comme un dommage de l'ADN, qui entraînerait *via* la machinerie de réparation de l'ADN l'activation de la protéine p53. Cette dernière provoquerait l'arrêt du cycle des cellules en activant la protéine p21 qui inhibe elle-même un facteur essentiel de la réplication de l'ADN, le facteur *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), ainsi que certains complexes de kinase (CDK). Cependant, d'autres gènes comme celui codant pour la protéine du rétinoblastome (pRb) sont également impliqués dans ce processus complexe de blocage du cycle cellulaire.

L'échappement des cellules à la sénescence répliquative est conféré par certains oncogènes viraux comme l'antigène T du *Simian Virus*

40 (Ag T SV40) et E6/E7 du virus du papillome humain de type 16 qui lient les produits de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme p53 et pRb. Les clones cellulaires résultants augmentent de plus de 30 fois le nombre de doublements de population [3]. Après le passage de la phase de sénescence, le raccourcissement des télomères se poursuit pour atteindre un seuil au-delà duquel sont observées des recombinaisons et des fusions interchromosomiques, et qui entraîne la mort cellulaire. Cette étape est appelée crise (figure 1B). Les cellules qui surmontent cette phase de crise sont considérées comme « immortalisées » et présentent une stabilisation de la longueur de leurs télomères, à l'origine de laquelle peuvent être impliqués une réactivation de la télomérase [4] ou, plus rarement, des mécanismes alternatifs peu connus (ALT) [5].

Le système Cre/Lox, un outil au service de la thérapie cellulaire

L'induction de la prolifération cellulaire présente un intérêt majeur pour la transplantation cellulaire à visée thérapeutique puisqu'elle permet d'amplifier à façon les cellules primaires. Néanmoins, l'utilisation d'un oncogène seul pose problème : après le passage de la phase de sénescence, des divisions forcées se produisent sans contrôle de la stabilité chromosomique avec accumulation de recombinaisons, de réactivations ou d'extinctions de gènes. En utilisant l'Ag T SV40 seul, les cellules amplifiées peuvent par conséquent acquérir les caractéristiques de cellules transformées après avoir réactivé certains protooncogènes. Il est donc nécessaire de pouvoir exciser l'oncogène avant la transplantation des cellules. L'équipe de G. Cossu a utilisé cette approche avec succès

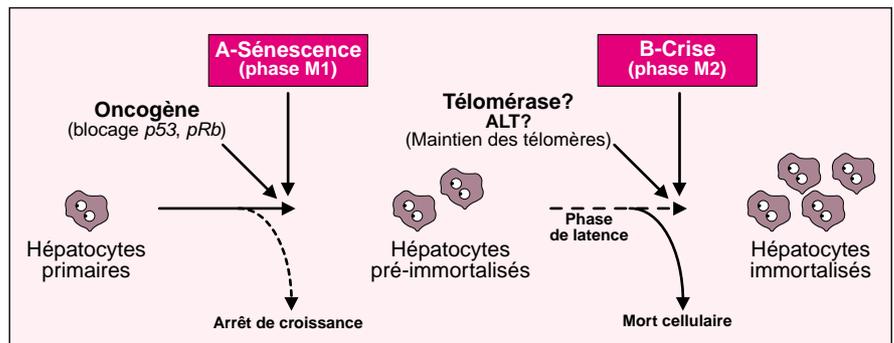


Figure 1. **Processus d'immortalisation.** A. Sénescence répliquative ou phase de mortalité 1 (M1) : période au cours de laquelle les cellules primaires, après plusieurs divisions, perdent leur potentiel prolifératif. Le transfert d'un oncogène permet à la cellule de surmonter cette phase et de continuer à se diviser. B. Crise ou phase de mortalité 2 (M2) : le raccourcissement des télomères atteint un seuil qui entraîne la mort cellulaire.

pour immortaliser de façon réversible des cellules primaires myogéniques humaines [6]. Ces cellules, qui ne sont disponibles qu'en faible quantité, se sont multipliées mille fois plus que les cellules primaires non modifiées. Il est important de noter que ces cellules amplifiées à l'aide de l'antigène T ne sont capables de se différencier en myotubes *in vivo* qu'après réversion. L'équipe de P. Leboulch avait, la première, validé un système d'expression réversible, le système Cre/Lox, dans l'immortalisation temporaire de différents types de cellules primaires de mammifères et leur expansion *ex vivo* [7]. Dans cette stratégie dite d'« immortalisation réversible », les cellules sont transduites avec un rétrovirus contenant le gène codant pour l'Ag T SV40 flanqué de sites Lox P (figure 2A). L'oncogène est ensuite excisé par recombinaison spécifique de site après transduction avec un virus porteur de la recombinaison Cre (figure 2B et 2C). Cette approche permet d'étu-

dier les mécanismes de différenciation cellulaire ainsi que les protéines du cycle cellulaire impliquées dans l'immortalisation et la sénescence. Plus récemment, cette même équipe, associée à celle de N. Kobayashi, a utilisé la même stratégie pour amplifier des hépatocytes humains et montrer l'efficacité thérapeutique de la transplantation cellulaire dans un modèle, toutefois imparfait, d'insuffisance hépatique aiguë chez le rat [8]. Cette approche est d'autant plus intéressante que les hépatocytes primaires ne dépassent normalement pas plus de un à deux doublings *in vitro*. L'infection de ces cellules par un adénovirus porteur du gène de la recombinaison Cre a permis l'excision de l'oncogène contenu entre les sites Lox. Les hépatocytes immortalisés avant ou après excision de l'oncogène ont été transplantés par voie intrasplénique chez des rats dont 90 % du foie avaient été enlevés. Cette chirurgie entraîne toujours la mort des animaux en 36 heures, dans un tableau d'insuffi-

sance hépatique caractéristique. En revanche, 60 % des rats transplantés ont survécu quel que soit le statut des cellules réimplantées. Ces résultats démontrent la faisabilité d'une expansion de cellules quiescentes ayant atteint un stade de différenciation terminale comme les hépatocytes humains. Ils montrent également qu'une petite quantité d'hépatocytes amplifiés (5 % de la masse hépatocytaire du foie) permet de surseoir à la mort par une insuffisance hépatique aiguë provoquée chez le rat.

Reste à déterminer quelles seront les conditions d'une telle application chez l'homme pour pouvoir envisager d'éventuels essais cliniques. Il faudra en particulier sélectionner des gènes d'immortalisation plus attirants que les oncogènes viraux. L'utilisation de la télomérase dans le cadre d'une amplification de cellules primaires a été proposée: elle permettrait de maintenir un génome cellulaire « propre » tout en diminuant le risque oncogénique [9], mais cet aspect est encore discuté puisqu'il semble que son expression active le proto-oncogène *c-myc* dans certains types cellulaires [10]. En théorie, il serait séduisant d'utiliser de telles cellules amplifiées dans le cadre de thérapies cellulaires mais également de thérapies géniques. Ce type d'approche a déjà conduit à la transplantation, dans la rate de rats *Gunn* déficients pour la bilirubine-UDP-glucuronosyltransférase, d'hépatocytes de rat, immortalisés avec un oncogène thermosensible et transduits avec le gène thérapeutique [11]. Le taux de bilirubine dans le sang a diminué durant une période significative d'environ trois mois. Cependant, afin d'observer un effet à plus long terme, les cellules immortalisées pourraient également être transduites avec des gènes thérapeutiques associés à des gènes impliqués dans la tolérance immunitaire. Enfin, parmi les perspectives thérapeutiques envisageables, on peut évoquer les tests de nouveaux médicaments sur des lignées d'hépatocytes humains immortalisés et transplantés dans un modèle animal ainsi que le développement, à plus long terme, de foies bioartificiels.

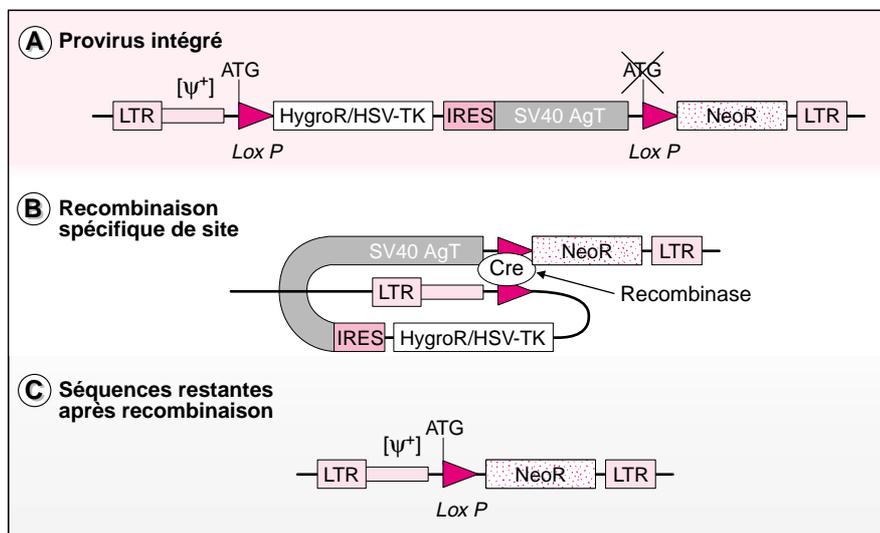


Figure 2. **Principe de l'immortalisation réversible.** A. Schéma du provirus rétroviral de Westerman et al. contenant l'antigène T de SV40 intégré dans la cellule primaire. B. Processus d'excision des séquences situées entre les sites Lox P après transduction de la cellule par un vecteur porteur du gène codant pour la recombinaison Cre. C. Provirus après excision: seule la copie du site Lox P portant l'ATG reste dans le génome de la cellule, permettant la traduction du gène de résistance à la néomycine et donc la sélection des cellules « révertées ». LTR: long terminal repeat; HygroR/HSV-TK: hygromycin resistance/ herpes simplex virus thymidine kinase; IRES: internal ribosomal entry site; NeoR: neomycin resistance gene.

1. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.

2. Ouellette M, Savre-Tain I. Les télomères et le vieillissement des cellules. *Med Sci* 2000; 16: 473-80.

3. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 -transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-3.

4. Ancellin K, Castellazi M, Gilson E. Télomères et cancer: les barrières tombent. *Med Sci* 2000; 16: 481-6.

5. Counter CN, Avilion AA, LeFeuvre CE, et al. Telomere shortening associated with chromosomal instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11: 1921-9.

6. Berghella L, De Angelis L, Coletta M, et al. Reversible immortalization of human myogenic cells by site-specific excision of retrovirally transferred oncogene. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1607-17.

7. Westerman KA, LeBoulch P. Reversible immortalization of mammalian cells mediated by retroviral transfer and site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8971-6.

8. Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, et al. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 2000; 287: 1258-62.

9. Bodnar A, Ouellette M, Frolkis M et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.

10. Wang J, Hannon GJ, Beach DH. Risky immortalization by telomerase. *Nature* 2000; 405: 755-6.

11. Tada K, Roy-Chowdhury N, Prasad V, et al. Long-term amelioration of bilirubin glucuronidation defect in Gunn rats by transplanting genetically modified immortalized autologous hepatocytes. *Cell Transplant* 1998; 7: 607-16.

Jean-Etienne Allain
Anne Weber

Équipe mixte Inserm 00-20, Laboratoire de transfert de gènes dans le foie : applications thérapeutiques, Hôpital Antoine-Béclère, Bâtiment Déméter, 157, rue de la Porte-de-Trivaux, 92141 Clamart, France.

Philippe LeBoulch

Harvard Medical School, Massachusetts Institute of Technology and genetix Pharmaceuticals, Inc., MIT E25-545, 77 Massachusetts avenue, Cambridge MA 02139, États-Unis.



Club Francophone des Cellules Dendritiques

Site Internet : <http://www.cochin.inserm.fr/CFCD>

ATELIER

Infection transmuqueuse des Cellules Dendritiques

Organisation : Daniel Bout, Colette Dezutter-Dambuyant, Anne Hosmalin, Laurent Misery

Lundi 27 novembre 2000

Hôpital Cochin, ICGM, 2^e étage, 22, rue Méchain, 75014 Paris
13 h 00 à 17 h 30 - limité à 80 participants

Programme :

- Physiologie des cellules dendritiques dans les différents types de muqueuses
- Micro-organismes et muqueuses : place des cellules dendritiques
- Modèles *in vivo* d'infection de cellules dendritiques des muqueuses
- Modèles *in vitro* d'infection de cellules dendritiques des muqueuses
- Table ronde : Entrée des micro-organismes, validité des modèles, induction de l'immunité muqueuse, tests de contrôle de l'immunité muqueuse, perspectives de nouvelles voies vaccinales

CONGRÈS ANNUEL DU CFCD

Mardi 28 novembre 2000

Maison de l'UNESCO, 7, place Fontenoy, 75007 Paris

Le Congrès inclut des conférences, des communications orales et communications affichées.

- ❖ **Session du matin : 28 novembre 2000 (9h 30-12h 15)**
 - Conférence : **Philippe Pierre** (France)
Biologie cellulaire de la présentation de l'antigène classe II restreinte dans les Cellules Dendritiques
Communications libres
 - Conférence : **Cornelis Melief** (Pays-Bas)
Anti-tumor immunotherapy – Immunothérapie antitumorale
- ❖ **Assemblée Générale du CFCD**
- ❖ **Déjeuner-Buffer avec visite des communications affichées (posters)**
- ❖ **Session de l'après-midi : 28 novembre 2000 (15h 15-18h 30)**
Communications libres
 - Conférence spéciale : **Jacques Banchereau** (USA)
Sous-populations de Cellules Dendritiques et leur utilisation
- ☞ **CONTACT SECRÉTARIAT CFCD :** Colette Dezutter-Dambuyant
Unité Inserm U. 346, Hôpital Édouard-Herriot
69437 LYON Cedex 03
e-mail : dezutter@lyon151.inserm.fr