

2 m 11. 2875. 9

Université de Montréal

Thérapie génique à la métallothionéine

par

Anne-Julie Boivin

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en biologie moléculaire

Août 2000

© Anne-Julie Boivin, 2000



QH
506
254
2001
v.011

()

()

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Thérapie génique à la métallothionéine

Présenté par :

Anne-Julie Boivin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Paul Jolicoeur, président-rapporteur

Dr Wagner Yotov, directeur

Dr Richard L. Momparler, co-directeur

Dr Jacques Galipeau, membre du jury

Mémoire accepté le : 14 mai 2001

Sommaire

Le cancer est une maladie grave et une cause importante de décès chez l'adulte et l'enfant. L'efficacité des médicaments antinéoplasiques est limitée par leur toxicité envers les cellules humaines normales, en particulier les cellules hématopoïétiques souches, un phénomène appelé "myélosuppression".

Les médicaments du groupe du carboplatine et du cisplatine sont utilisés dans le traitement de plusieurs types de cancer. Cependant, la chimiothérapie aux agents de ce groupe est limitée par leur myélotoxicité. Notre idée est de développer une thérapie génique pour protéger les cellules souches hématopoïétiques des patients contre les effets toxiques des médicaments du groupe du carboplatine et du cisplatine. Le gène MT, codant pour la protéine métallothionéine, lorsque transféré et exprimé dans des cellules souches hématopoïétiques normales, pourrait effectuer cette protection. L'implication de la métallothionéine dans la résistance contre les médicaments du groupe platine a déjà été proposée.

Nos objectifs à court terme étaient de cloner le gène MT dans un vecteur lentiviral à expression constitutive et dans un vecteur d'expression rétroviral dépendant de la tétracycline (système Tet-On), afin de vérifier la capacité du gène MT cloné dans ces vecteurs et transfecté dans des cellules murines et humaines de protéger ces dernières contre les effets toxiques du carboplatine et du cisplatine.

Nous avons cloné le gène MT dans le vecteur lentiviral à expression constitutive pHR'CMV et dans le vecteur rétroviral dépendant de la tétracycline pRevTRE. Les cellules BOSC23 transfectées transitoirement avec le vecteur lentiviral pHR'CMV-MT ont été soumises à un essai clonogénique afin d'évaluer leur potentiel de clonogénicité après une exposition à un médicament.

De la résistance chez les cellules BOSC23-MT a été observée à certaines concentrations, comparativement aux cellules contrôles. Les cellules A549 et DA-3 ont été transfectées de façon stable avec les vecteurs pRevTRE-MT et pRevTet-On. Elles ont été soumises à des essais clonogéniques et des essais MTT (essais d'inhibition de croissance). Aucune résistance n'a été observée contre les médicaments du groupe platine chez les cellules A549-MT et DA-3-MT, comparativement aux cellules non-transfectées.

Nous concluons que le gène MT dans le contexte d'un vecteur lentiviral et sous le contrôle d'un promoteur fort CMV protège les cellules BOSC23 contre l'effet toxique du carboplatine et du cisplatine. Cette protection est cependant absente dans le contexte d'un vecteur rétroviral classique dont l'expression du gène MT dans les cellules A549-MT et DA-3-MT est sous le contrôle du système Tet-On.

Table des matières

SOMMAIRE	III
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	X
INTRODUCTION	1
I : LA CHIMIOTHÉRAPIE DU CANCER	1
<i>I. I : Succès et limites de la chimiothérapie.....</i>	<i>1</i>
<i>I. II : Les médicaments à base de platine</i>	<i>2</i>
II. II. I : Spectre d'action de l'activité antitumorale	2
I. II. II : Structure.....	2
I. II. III : Mécanisme d'action.....	3
I. II. IV : Résistance.....	5
I. II. V : Toxicité et effets secondaires	6
II : LA THÉRAPIE GÉNIQUE	6
<i>II. I : Introduction.....</i>	<i>6</i>
<i>II. II : Vecteurs pour la thérapie génique</i>	<i>7</i>
II. II. I : Introduction.....	7
II. II. II : Vecteurs rétroviraux	7
II. II. III : Vecteurs lentiviraux	12
II. II. IV : Vecteurs dépendants de la tétracycline	13
II. II. IV. I : Description.....	13
II. II. IV. II : Désavantages.....	16
II. II. IV. III : Applications	17
III : LA CHIMIOPROTECTION	17
<i>III. I : Introduction.....</i>	<i>17</i>
<i>III. II : Exemples de chimioprotection.....</i>	<i>18</i>
III. II. I : MDR1 (<i>multidrug resistance gene 1</i>).....	18
III. II. II : DHFR (<i>dihydrofolate reductase</i>)	19
III. II. III : MGMT (<i>O⁶-methylguanine DNA methyltransferase</i>).....	20
III. II. IV : CD (<i>cytidine deaminase</i>)	21
III. II. V : MT (méthallothionéines)	21
III. II. V. I : Biologie moléculaire et biochimie.....	21
III. II. V. II : Résistance aux médicaments.....	23
OBJECTIFS	24
MATÉRIEL ET MÉTHODES	25

I : LIGNÉES CELLULAIRES	25
II : CLONAGE ET PLASMIDES	25
<i>II. I : Vecteur lentiviral</i>	25
<i>II. II : Système Tet-On</i>	26
III : TRANSFECTIONS ET SÉLECTIONS	28
V : ESSAIS CYTOTOXIQUES	28
<i>V. I : Essai clonogénique</i>	28
<i>V. II : Essai d'inhibition de croissance</i>	29
VI : RT-PCR SEMI-QUANTITATIF	30
VII : ANALYSES STATISTIQUES	32
RÉSULTATS	33
I : LENTIVIRUS	33
<i>I. I : Plasmides</i>	33
<i>I. II : Essai clonogénique</i>	34
II : SYSTÈME RÉTROVIRAL TET-ON	36
<i>II. I : Plasmides</i>	36
<i>II. II : RT-PCR semi-quantitatif</i>	37
<i>II. III : Essais clonogéniques</i>	40
<i>VI : Essais d'inhibition de croissance</i>	44
DISCUSSION.....	48
RÉFÉRENCES	54
ANNEXE	XII
CHROMATOGRAMME DU SÉQUENÇAGE DU GÈNE MT CLONÉ DANS LE PLASMIDE RECOMBINANT P _{REV} -TRE.....	XII
REMERCIEMENTS	XIII

Liste des tableaux

Tableau I :	Colonies développées après une exposition au carboplatine.....	35
Tableau II :	Effet du carboplatine sur la clonogénicité des cellules A549 et A549-MT.....	41
Tableau III :	Effet du cisplatine sur la clonogénicité des cellules A549 et A549-MT.....	41
Tableau IV :	Effet du carboplatine sur la clonogénicité des cellules DA-3 et DA-3-MT.....	42
Tableau V :	Effet du cisplatine sur la clonogénicité des cellules DA-3 et DA-3-MT.....	42
Tableau VI :	Effet du carboplatine sur la mortalité des cellules A549 et A549-MT.....	45
Tableau VII :	Effet du cisplatine sur la mortalité des cellules A549 et A549-MT.....	45
Tableau VIII :	Effet du carboplatine sur la mortalité des cellules DA-3 et DA-3-MT.....	46
Tableau IX :	Effet du cisplatine sur la mortalité des cellules DA-3 et DA-3-MT.....	46

Liste des figures

Figure 1 :	Structure du cisplatine et du carboplatine.....	2
Figure 2 :	Le cycle de réplication du rétrovirus.....	8
Figure 3 :	Transduction d'une cellule cible par un rétrovirus défectueux....	9
Figure 4 :	Production de virus recombinants.....	11
Figure 5 :	L'opéron Tet.....	14
Figure 6 :	Le système Tet-Off.....	15
Figure 7 :	Le système Tet-On.....	16
Figure 8 :	Séquence complète du gène MT-Ia.....	22
Figure 9 :	Séquences importantes entre les LTR 5' et 3' du vecteur lentiviral pHR'CMV.....	26
Figure 10 :	Séquences importantes entre les LTR 5' et 3' du plasmide pRev- TRE.....	27
Figure 11 :	Séquences importantes entre les LTR 5' et 3' du plasmide pRev- Tet-On.....	27
Figure 12 :	Séquence de l'ADNc et séquence prédite des acides aminés du gène MT.....	34
Figure 13 :	Photos de colonies observées à 600 μ M lors d'un essai clonogénique sur les cellules BOSC23, BOSC23-LacZ et BOSC23-MT.....	35
Figure 14 :	Analyse par RT-PCR semi-quantitatif de l'activation de l'expression du transgène MT par la doxycycline, sur les cellules A549 et A549-MT.....	38
Figure 15 :	Analyse par RT-PCR semi-quantitatif de l'activation de l'expression du transgène MT par la doxycycline, sur les cellules DA-3 et DA-3-MT.....	39

Figure 16 :	Effet du cisplatine sur la clonogénicité des cellules DA-3 et DA-3-MT.....	43
Figure 17 :	Effet du cisplatine sur la clonogénicité des cellules DA-3 et DA-3-MT.....	47
Annexe :	Chromatogramme du séquençage du gène MT cloné dans le plasmide recombinant pRev-TRE.....	xii

Liste des sigles et abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique
- ADNc : ADN complémentaire
- Ara-C : *cytosine arabinoside*
- ARN : acide ribonucléique
- ATCC : American Tissue Culture Collection
- ATP : adénosine triphosphate
- 5-AZA-CdR : *5-aza-2'-deoxycytidine*
- BBN : N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine
- CaMKII α : *calcium-calmodulin-dependent kinase II* de type α
- CD : *cytidine deaminase*
- CHO : *Chinese hamster ovary*
- CMV : cytomégalovirus
- ddNTP : didésoxynucléoside triphosphate
- dFdC : *2',2'-difluoro-deoxycytidine*
- DHFR : *dihydrofolate reductase*
- Dox : doxycycline
- ED₅₀ : *effective dose 50*
- ELISA : *enzyme-linked immunosorbant assay*
- GFP : *green fluorescent protein* (protéine fluorescente verte)
- GSH : *γ -glutamyl-cysteinyl-glycine* ou glutathione
- GPDH : *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
- h : heure
- Hyg^r : gène de résistance à l'hygromycine
- IRES : *internal ribosome entry site* (site d'entrée interne des ribosomes)
- LD₅₀ : *lethal dose 50* (dose létale 50 %)
- LTR : *long terminal repeat* (longues répétitions terminales)
- MCS : *multiple cloning site* (région de sites multiples pour le clonage)

MDR1 : *multiple drug resistance gene 1* (gene 1 de résistance aux médicaments)

MGMT : *O⁶-methylguanine DNA methyltransferase*

Microglob : microglobuline

MT : métallothionéine, isoforme MT-Ia

MTT : *(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)*

n : nombre d'échantillons

NADPH : *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, forme réduite

Neo^r : gène de résistance de la néomycine

NSCLC : *non small cell lung carcinoma* (cancer des poumons aux non-petites cellules)

P : promoteur

pb : paire de bases

PBS : *phosphate-buffered saline*

PCR : *polymerase chain reaction*

POMC : *proopiomelanocortin*

Pt : platine

Réf : référence

Rep : répresseur

RT : *reverse transcriptase*

RT-PCR : *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

rtTA : *reverse tetracycline-controlled transactivator*

SCLC : *small cell lung carcinoma* (cancer des poumons aux petites cellules rondes)

SD : *standard deviation* (écart type)

tet : tétracycline

TRE : *tetracycline responsive element*

tTA : *tetracycline-controlled transactivator*

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VSV G : glycoprotéine G de *vesicular stomatitis virus*

INTRODUCTION

I : LA CHIMIOTHÉRAPIE DU CANCER

I. I : Succès et limites de la chimiothérapie

Depuis quelques décennies, de nombreux agents cytotoxiques ont été développés et ont amélioré les taux de survie de patients atteints du cancer. Cependant, la chimiothérapie contre le cancer, en particulier le métastatique, n'est pas toujours efficace. L'échec du traitement peut être dû au développement de la résistance des cellules cancéreuses aux agents antinéoplasiques [1] ou à la toxicité pour les cellules normales du patient [2].

Le dogme courant en chimiothérapie du cancer préconise l'administration d'une dose forte dans le but d'obtenir un meilleur pronostic [3]. Cette approche est largement répandue en clinique aujourd'hui. Cependant, la plupart des agents chimiothérapeutiques ont un petit index thérapeutique, ce qui limite l'administration de doses élevées [4].

L'index thérapeutique d'un médicament est un ratio entre deux doses. Il s'agit d'une division de la dose létale chez 50 pour cent des sujets (LD_{50}) par la dose efficace chez 50 pour cent des sujets (ED_{50}) [5]. Plus l'index est bas, plus il y a de chances pour un patient de subir des effets toxiques. Les médicaments ayant un index thérapeutique bas sont des agents pour lesquels un petit changement en concentration systémique peut mener à des changements importants dans la réponse thérapeutique. Une dose soit trop minime, soit trop grande d'un tel médicament peut entraîner, soit un traitement inefficace, soit un effet toxique [6].

I. II : Les médicaments à base de platine

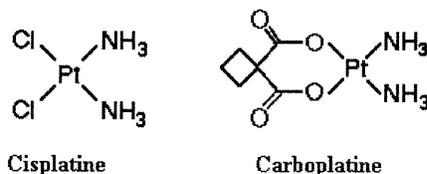
II. II. I : Spectre d'action de l'activité antitumorale

Le cisplatine (cis-dichlorodiammineplatinum II, ou cysplatyl) et le carboplatine (cis-diammine-[1,1-cyclobutanedicarboxylato] platinum, ou paraplatine) sont des médicaments anticancéreux à base de platine. Ils sont parmi les médicaments antinéoplasiques cytotoxiques les plus utilisés en chimiothérapie et ont un spectre d'action étendu [7].

Le cisplatine est un des agents les plus efficaces pour le traitement de plusieurs tumeurs solides chez les humains tels le cancer de l'œsophage [8], des testicules [9, 10], des ovaires, de la vessie, des poumons (SCLC et NSCLC) [10, 11], du cou et de la tête [10-12]. Le carboplatine, un médicament de deuxième génération [13], est utilisé pour le même type de tumeurs que le cisplatine [14].

I. II. II : Structure

Les médicaments à base de platine ont une structure inhabituelle si on les compare aux autres agents néoplasiques. Ils sont organométalliques ; ils contiennent l'élément métallique platine, tandis que la majorité des autres agents chimiothérapeutiques sont seulement organiques [15].



Source : Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Calabresi P (1996) [8].
 Figure 1. Structure du cisplatine et du carboplatine.

I. II. III : Mécanisme d'action

Les études sur le cisplatine, qui représentent la source principale d'informations sur les propriétés des médicaments à base de platine [15], indiquent qu'ils sont cytostatiques [10]. Le cisplatine est une molécule stable. Dans des conditions aqueuses tel le plasma sanguin, environnement où la concentration de chlore peut dépasser 100 mM, il reste inerte. Cependant, il se comporte différemment dans la cellule, où la concentration de chlore est moindre [15].

L'hypothèse sur le mode d'entrée du cisplatine dans la cellule inclut deux mécanismes [16]. Il peut entrer dans la cellule par diffusion passive [17] ou par des canaux transmembranaires [16]. Ce dernier processus requiert de l'énergie et comprend des mécanismes d'efflux et d'influx [18].

Après l'entrée dans la cellule, le cisplatine [7, 15, 19] et le carboplatine [7] subissent une hydrolyse et deviennent des molécules hydratées identiques. En effet, le cisplatine perd ses deux molécules de chlore et le carboplatine perd son groupement cyclobutanedicarboxylato bidentate [8]. Les deux molécules ne conservent que la partie $\text{NH}_3\text{-Pt-NH}_3$ et sont positivement chargées. Ces molécules sont électrophiles et actives [7].

Le cisplatine et le carboplatine agissent ensuite d'une manière similaire aux agents alkylants. Après la réaction d'activation, la molécule est capable de réagir avec des groupes nucléophiles ; elle peut former un ou deux liens covalents avec les protéines, l'ADN et l'ARN [19, 20]. Ceci peut entraîner une formation de ponts entre les macromolécules [19]. Environ 1 pour cent du cisplatine et du carboplatine réagit avec l'ADN génomique, menant à des adduits et des ponts intra- et inter-brin. La position N-7 de la guanine est le plus fréquemment atteinte et on retrouve très souvent des ponts intra-brin entre deux guanines adjacentes [19, 21, 22].

Plusieurs observations laissent croire que le dommage infligé par le cisplatine et le carboplatine sur l'ADN soit l'événement cytotoxique [23-32]. Par exemple, des lignées cellulaires ayant un mécanisme de réparation par excision de nucléotide déficient sont hypersensibles à ces médicaments [24-26]. Certaines lignées cellulaires résistantes au cisplatine ont une capacité plus élevée à réparer le dommage causé par le cisplatine à l'ADN. Des inhibiteurs de la réparation de l'ADN peuvent augmenter la toxicité causée par le cisplatine [27-32]. La cytotoxicité possible des dommages causés par le cisplatine à l'ARN et aux protéines est moins claire [7].

Le cisplatine et le carboplatine forment des lésions identiques dans l'ADN ; néanmoins, la cinétique du carboplatine est plus lente [33]. Le carboplatine est, *in vitro*, de deux à 50 fois moins puissant que le cisplatine [14, 23]. Cependant, *in vivo*, le degré de liaison du carboplatine au plasma est moindre que pour le cisplatine (entre 10 et 24 pour cent *versus* 90 pour cent) alors les quantités requises pour l'efficacité du carboplatine sont en fait seulement trois à quatre fois plus élevées que celles du cisplatine [14].

Le cisplatine [34-37] et le carboplatine [34, 35, 38] peuvent causer l'apoptose de cellules mises en culture, par exemple les cellules leucémiques murines L1210 et les lignées cellulaires CHO [34, 35]. De la nécrose peut être causée aussi par le carboplatine [38]. *In vivo*, le mécanisme en jeu n'est pas clair [7].

Le mécanisme par lequel la cellule meurt à la suite de lésions sur l'ADN produites par les médicaments à base de platine est inconnu. Il a été suggéré que le cycle cellulaire est impliqué dans le mécanisme ; des études ont démontré que des cellules en division sont plus susceptibles de mourir sous l'effet du cisplatine que des cellules non-divisantes [39]. Il semble que

généralement, les cellules en phase S meurent plus que celles en d'autres phases du cycle cellulaire [40].

I. II. IV : Résistance

Des cellules cancéreuses résistantes aux médicaments du groupe platine peuvent se développer chez la majorité des patients traités avec ces médicaments [41-43]. En outre, certaines tumeurs sont initialement naturellement résistantes à ces médicaments, tels les cancers colorectaux et pancréatiques. L'acquisition ou la présence de résistance au cisplatine et au carboplatine représentent un problème clinique majeur. Il y a plusieurs facteurs impliqués dans le développement de ce processus [7]. Les modèles de mécanismes de résistance ont surtout été élaborés en observant des cellules résistantes au cisplatine *in vitro* [15].

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la résistance ; on peut les regrouper en deux catégories [7]. La première comprend les mécanismes qui limitent la possibilité des médicaments de causer des dommages à l'ADN : une diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments par diminution de l'influx [44, 45] et une augmentation de la détoxification par des thiols cellulaires tels le glutathione et la protéine métallothionéine [41, 46, 47].

Dans la deuxième catégorie, on retrouve les mécanismes qui permettent à une cellule de tolérer ou de réparer les dommages : un enlèvement des adduits Pt-ADN par un procédé d'excision et de polymérisation [48], un défaut dans la réparation des *mismatches* menant à une tolérance plus élevée des dommages causés à l'ADN [41, 49-51] et la prévention de l'apoptose [41].

I. II. V : Toxicité et effets secondaires

Le cisplatine cause beaucoup d'effets secondaires : néphrotoxicité, neurotoxicité, vomissements, ototoxicité [14, 15], nausées, myélosuppression [15] et interférence avec l'activité des plaquettes sanguines [52]. Le carboplatine présente des effets secondaires moindres et son index thérapeutique est donc plus élevé que celui du cisplatine. Cet analogue du cisplatine, développé spécifiquement pour diminuer les effets secondaires [13], cause rarement de la néphrotoxicité [53], de la neurotoxicité, des nausées et des vomissements [54]. Ses effets secondaires majeurs sont la thrombocytopénie sévère [14], l'anémie, la neutropénie [15] et la myélosuppression [15, 55]. Ceux-ci représentent les facteurs limitants pour l'augmentation des doses de carboplatine [14, 55].

II : LA THÉRAPIE GÉNIQUE

II. I : Introduction

L'identification des défauts génétiques responsables de certaines maladies a fait de la thérapie génique une option de traitement attrayante [56]. Il s'agit de corriger un défaut génétique en insérant le gène fonctionnel dans la cellule ciblée [57]. Au cours des dix dernières années, plus de 4000 patients ont participé à des expériences de thérapie génique, mais seulement quelques résultats concluants ont été obtenus [58]. Le succès le plus récent s'est produit au cours du mois d'avril 2000 en France ; deux enfants atteints d'immunodéficiência sévère combinée héréditaire ont eu un transfert d'ADNc du gène γc dans les cellules de leur moelle osseuse [59]. Cependant, le succès n'est pas toujours atteint. Au moins un patient est mort lors d'un essai clinique de thérapie génique, qui employait les adénovirus en tant que vecteurs, en septembre 1999 [58, 60].

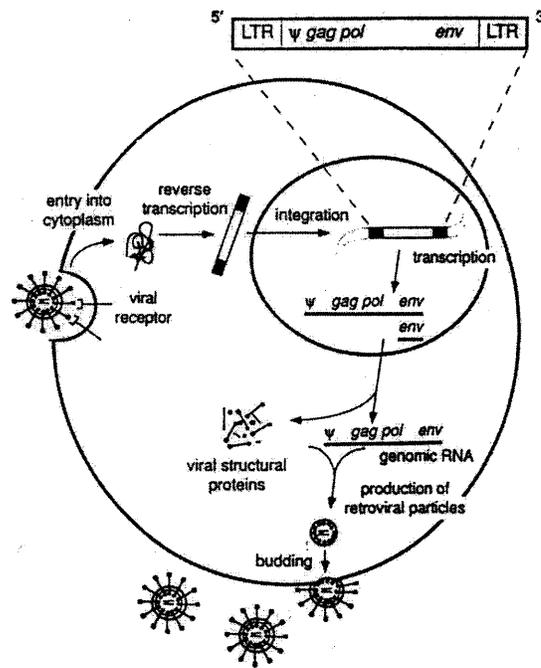
II. II : Vecteurs pour la thérapie génique

II. II. I : Introduction

Le succès de la thérapie génique dépend largement du système utilisé pour introduire le gène thérapeutique à l'intérieur des cellules cibles [56]. Plusieurs méthodes existent pour effectuer ce transfert et impliquent des procédures chimiques, physiques et virales [61]. Dans ce mémoire, l'emphase est sur certains vecteurs viraux. Les systèmes de vecteurs utilisés doivent être précis. Le meilleur vecteur candidat n'est pas le même pour chaque maladie ciblée par la thérapie génique [56].

II. II. II : Vecteurs rétroviraux

Les vecteurs rétroviraux sont des virus utilisés pour insérer du matériel génétique dans une cellule. Ils proviennent de rétrovirus isolés de rongeurs ou de poulets. Ils ont été altérés par la suite pour le transfert de gènes. Le génome des rétrovirus est constitué d'ARN. L'entrée de la particule virale dans la cellule résulte d'une interaction avec un récepteur viral situé à la surface de la cellule. Immédiatement après l'entrée du virus, une transcriptase inverse produit un transcrite d'ADN linéaire double-brin. La transcriptase inverse est un produit du gène viral *pol*, et est présente dans la particule virale avant l'infection. Lorsque la cellule est en mitose, l'ADN viral a alors accès au noyau et s'intègre au génome grâce au produit du gène *int*, déjà présent lui aussi dans la particule virale avant l'infection. L'intégration se fait au hasard dans le génome de la cellule hôte. L'ADN viral intégré est appelé provirus. Le provirus est ensuite transcrite, sous le contrôle du promoteur LTR à l'extrémité 5'. Ce transcrite sert à synthétiser les protéines codées par les gènes *gag*, *pol* et *env*. Elles sont nécessaires à l'assemblée de nouveaux virus. Le transcrite non-épissé sera encapsidé car il contient le signal d'encapsidation Ψ . Les nouvelles particules de virus bourgeonnent et sont prêtes à attaquer d'autres cellules [62].

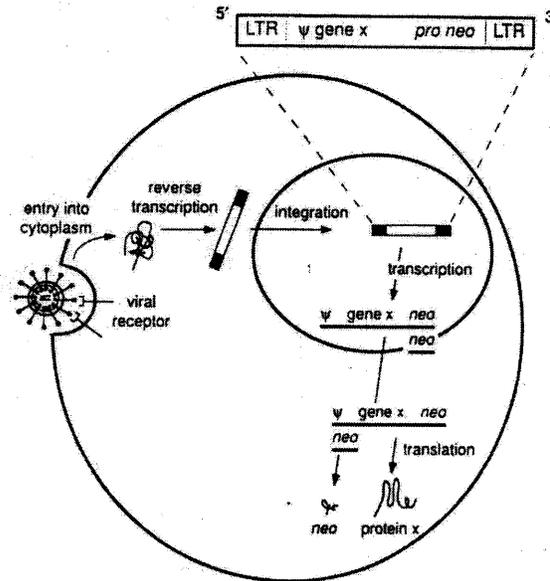


Source : Current Protocols in Molecular Biology [62]

Figure 2. Le cycle de réplication du rétrovirus. Le virus entre dans la cellule grâce à un récepteur viral. La transcriptase inverse produit de l'ADN double-brin à partir de l'ARN viral. Durant la mitose, l'ADN viral a accès à l'ADN cellulaire nucléaire et s'y intègre. L'ADN viral est ensuite transcrit. Ce transcrit sert à synthétiser des protéines à partir des gènes *gag*, *pol* et *env*. Ces protéines sont nécessaires à l'assemblage des nouveaux virus. Le transcrit non-épissé contient un signal d'encapsidation Ψ qui lui permet d'être reconnu par les protéines d'assemblage et d'être encapsidé. Après l'encapsidation, le virus bourgeonne hors de la cellule.

Ces rétrovirus ont été modifiés génétiquement afin de diminuer le risque pour les patients et augmenter la taille et l'expression du transgène qui pourrait être inséré dans le vecteur, pour en faire des outils en recherche génétique. Certains éléments génétiques nécessaires pour l'infection virale ont été éliminés et remplacés avec le transgène (le matériel génétique à introduire dans la cellule cible). Par exemple, les gènes *gag*, *env* et *pol* sont enlevés [63]. Les promoteurs LTR, le signal d'encapsidation Ψ , les *enhancers* et les séquences de polyadénylation sont cependant conservés. Le virus n'est donc plus infectieux, parce qu'en l'absence des gènes *gag*, *pol* et *env* il est incapable de se répliquer et

d'amorcer une infection. Il n'est capable que de s'intégrer dans le génome de la cellule et de transcrire son ADN génomique [62].

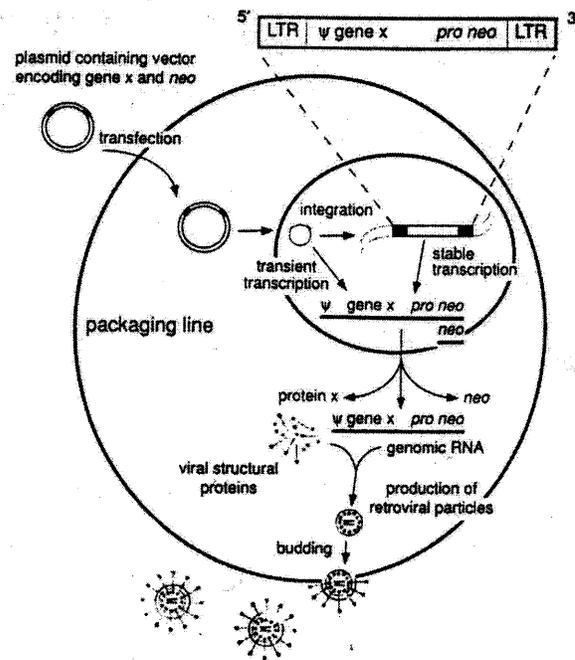


Source : Current Protocols in Molecular Biology [62]

Figure 3. Transduction d'une cellule cible par un rétrovirus déficient (incapable de se répliquer). Les transgènes "x" et "neo" y sont clonés. Les premières étapes de la transduction de la cellule sont identiques à celles des rétrovirus non-modifiés génétiquement : le rétrovirus entre dans la cellule à l'aide du récepteur viral, puis la transcriptase inverse produit de l'ADN double-brin qui s'intègre au génome de la cellule suite à une mitose. L'ADN viral contient les transgènes. Les séquences *gag*, *pol* et *env* ne sont pas incluses. L'ARN viral transcrit contient les informations nécessaires pour la traduction des transgènes.

Pour obtenir ce type de virus qui peut livrer le transgène, mais qui est incapable de se répliquer, on a recours à des lignées cellulaires d'encapsidation. Ces lignées cellulaires ont été génétiquement manipulées. Plusieurs lignées cellulaires d'encapsidation différentes sont disponibles. Ces lignées confèrent aux virus obtenus quelques particularités qui diffèrent selon la lignée utilisée [62].

Les cellules d'encapsidation détiennent et transcrivent les gènes *gag*, *pol* et *env*. Tel qu'indiqué ci-dessus, ces éléments sont manquants dans le génome viral des rétrovirus recombinants incapables de se répliquer. Un ou plusieurs plasmides contenant des éléments rétroviraux, sauf *gag*, *pol* et *env*, sont requis. Le gène d'intérêt et un gène de sélection peuvent y être clonés aussi. Dans ce type de cellules seulement, la transfection d'un tel plasmide permet l'assemblée d'un virus. Après l'intégration du plasmide dans le génome de ces cellules, l'ARN viral est produit, et les protéines encodées peuvent être traduites. Cet ARN en soi ne peut diriger l'assemblage de nouveaux virus. Cependant, l'assemblage se produit quand même, grâce aux produits des gènes *gag*, *pol* et *env* qui sont compris la cellule d'encapsidation. Dans des cellules normales (non-modifiées génétiquement en laboratoire), ces protéines ne sont pas produites et la formation de nouveaux virus n'est pas possible [62].



Source: Current Protocols in Molecular Biology [62]

Figure 4. Production de virus recombinants, vecteurs pour la thérapie génique, incapables de se répliquer. Le plasmide contient le gène d'intérêt *x*, le gène de sélection (e.g. *neo*) et quelques éléments rétroviraux sauf *gag*, *pol* et *env*. Après une transfection et une intégration au génome de la cellule, les gènes *x* et *neo* sont transcrits et traduits. Le transcrit non-épissé contient le signal d'encapsidation Ψ , ce qui lui permet d'être encapsidé. L'encapsidation est rendue possible grâce aux protéines encodées par les gènes *gag*, *pol* et *env* dans la cellule d'encapsidation.

Comme suite à son intégration dans un chromosome de la cellule hôte, le transgène est exprimé de façon stable pour une longue période [58, 62], causant des modifications permanentes [63]. Ce système est efficace et ne produit pas de réponse immunitaire [58]. Par contre, le titre obtenu est généralement bas [63].

Les rétrovirus sont capables d'infecter et de transduire des cellules hématopoïétiques. Les cellules souches hématopoïétiques étant de nature quiescente, il faut les stimuler avec des facteurs de croissance. Ceci stimule les

divisions, permettant une transduction, mais on croit que cela les différencie aussi [63].

II. II. III : Vecteurs lentiviraux

La famille Retroviridae est divisée en trois sous-familles : Oncoviridae, Lentiviridae et Spumaviridae. Les rétrovirus décrits ci-dessus font partie de la famille Oncoviridae. Les lentivirus, tel le VIH, sont membres de la sous-famille Lentiviridae et ont un cycle infectieux similaire à celui des autres rétrovirus [64]. Dans ce mémoire, les vecteurs lentiviraux seront différenciés des vecteurs rétroviraux classiques.

Une équipe de chercheurs, dirigée par Verma et Trono, a récemment exploité les caractéristiques du lentivirus pour rendre possible l'obtention de lentivirus défectueux d'une manière analogue aux rétrovirus "classiques" [65]. Ce qui les différencie des rétrovirus classiques est leur avantage de pouvoir transduire des cellules mitotiques et des cellules non-mitotiques [58, 65]. Cette capacité vient de leur signal de localisation nucléaire, qui permet l'entrée du génome viral à travers la membrane nucléaire intacte des cellules qui ne sont pas en division [66].

Plusieurs expériences ont été effectuées avec ce type de vecteur [65]. Les vecteurs dérivés du lentivirus peuvent transduire une variété de cellules humaines quiescentes, par exemple les neurones [65, 67-69], les macrophages [65, 70], les hépatocytes, les myocytes cardiaques [71] et les cellules hématopoïétiques [72-75]. Ces virus sont souvent pseudotypés par la glycoprotéine VSV G. La présence de cette glycoprotéine étrangère sur la membrane virale permet aux particules virales de se lier de façon non-spécifique aux phospholipides membranaires des cellules ciblées [76], ce qui augmente l'efficacité de transduction [72]. Le VIH étant dangereux, les vecteurs

dérivés sont développés en fonction de la biosécurité, pour éviter les risques associés à son utilisation [66, 68, 77].

II. II. IV : Vecteurs dépendants de la tétracycline

II. II. IV. I : Description

Dans la plupart des thérapies géniques, l'expression du transgène est contrôlée par un promoteur constitutif. Un tel promoteur ne permet aucune commande temporelle et quantitative de l'expression du transgène. L'utilisation de promoteurs pouvant être induits permet une régulation de l'expression du transgène en quantité et en temps. Ces promoteurs permettent donc d'éviter des effets néfastes pouvant être causés par une surexpression du transgène [78].

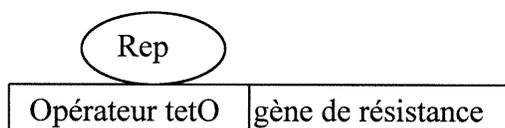
Plusieurs promoteurs eucaryotes pouvant être induits ont été caractérisés et utilisés pour réguler l'expression de transgènes : promoteurs pouvant être induits par des hormones, des métaux lourds, un manque de métabolite ou un stimulus physique. Ces promoteurs ne sont cependant pas idéaux dans le cadre de la thérapie génique, car une régulation exogène pourrait aussi induire l'expression de gènes autres que le transgène (effets pléiotropiques). De plus, les agents qui induisent ces promoteurs sont habituellement des molécules endogènes, et leur niveau ne peut être contrôlé adéquatement [78].

Un système d'induction idéal devrait posséder trois caractéristiques. Premièrement, il doit être spécifique : l'induction devrait se faire à l'aide d'une molécule inerte exogène qui induit spécifiquement la transcription du transgène sans influencer la transcription des gènes endogènes [78, 79]. Deuxièmement, il doit être efficace : il doit montrer un niveau d'expression basal très bas lorsqu'il n'est pas induit, et atteindre rapidement un haut niveau d'expression lorsqu'il est induit et il doit aussi pouvoir être efficacement ramené à son état non-induit.

Troisièmement, il doit permettre la gestion du niveau d'expression du gène avec une quantité déterminée de l'inducteur [79].

Quelques systèmes d'induction ayant ces caractéristiques ont été mis au point : les systèmes inductibles à la tétracycline, à la FK506/rapamycine, au RU486/mifepristone et à l'ecdysone [79]. Le système d'expression dépendant de la tétracycline a été élaboré par Gossen *et al* [80, 81]. Il est entièrement procaryote. La bactérie *Escherichia coli* possède un gène de résistance à la tétracycline sur le transposon Tn 10. L'expression de ce gène est contrôlée par un répresseur constitutif lié à des séquences opératrices. Ce répresseur peut cependant être inactivé en présence de tétracycline en s'y liant, ce qui occasionne un changement de conformation. Alors, le répresseur n'est plus lié aux séquences opératrices et la transcription du gène de résistance à la tétracycline a lieu.

Absence de tétracycline



Présence de tétracycline

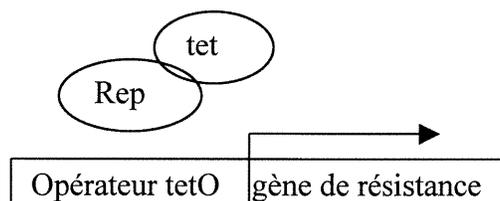
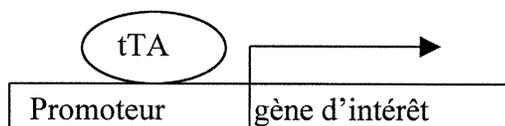


Figure 5. L'opéron Tet. Le répresseur constitutif est lié à la séquence opératrice de l'opéron Tet. Ceci empêche la transcription du gène de résistance. Cependant, en présence de tétracycline il cesse de réprimer la transcription. La liaison du répresseur et de la tétracycline cause un changement de conformation et entraîne une cessation de l'interaction entre le répresseur et les séquences opératrices. La transcription des gènes de résistance à la tétracycline est donc autorisée, permettant à la bactérie *Escherichia coli* de survivre.

Deux systèmes en fonction de la tétracycline ont été développés à partir de ces éléments : le système Tet-Off et le système Tet-On. Dans le système Tet-Off, la transcription du transgène est inhibée en présence de tétracycline. Le

répresseur a été fusionné avec le domaine transactivateur de la protéine VP16 du virus de l'herpes simplex. La protéine de fusion obtenue, tTA, induit la transcription d'un transgène en se liant à son promoteur synthétique. Ce promoteur dérivé de l'opéron Tet est constitué de sept copies de l'opérateur tetO, en amont d'une boîte TATA. Cette boîte TATA est dérivée du promoteur *immediate early* du CMV. Lorsque la tétracycline est présente, elle se lie à la protéine chimérique, causant un changement de conformation, le détachement de la protéine et l'interruption de la transcription du gène [80, 81].

Absence de tétracycline



Présence de tétracycline

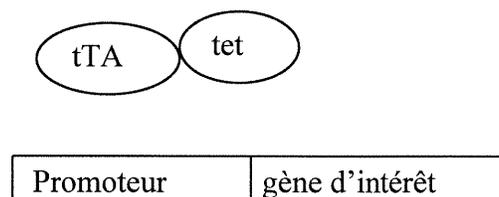


Figure 6. Le système Tet-Off. La protéine tTA, une fusion du répresseur et de la partie transactivatrice de la protéine VP16 du virus de l'herpès simplex, est liée constitutivement au promoteur synthétique. L'interaction entre tTA et le promoteur synthétique stimule la transcription du transgène. Cette transcription est supprimée par l'addition de tétracycline, qui se lie à tTA.

Dans le système Tet-On, la transcription est activée en présence de tétracycline. Une forme mutante de la protéine de fusion tTA a été développée ; elle a quatre acides aminés différents dans la partie du répresseur. Cette nouvelle protéine chimérique, nommée rtTA, se lie seulement à l'opérateur en présence de tétracycline et induit la transcription [80, 81].

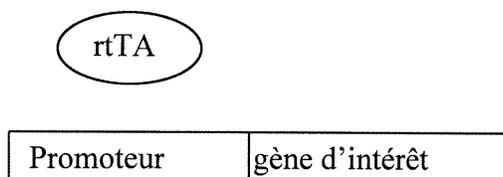
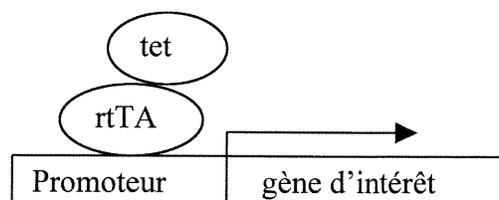
Absence de tétracycline**Présence de tétracycline**

Figure 7. Le système Tet-On. La protéine chimérique rtTA, différente de la protéine tTA par quatre acides aminés, ne se lie au promoteur synthétique qu'en présence de tétracycline pour activer la transcription.

Les gènes codant pour les protéines de fusion tTA ou rtTA peuvent être situés sur le même plasmide que celui comprenant le promoteur synthétique et le transgène, ou sur un plasmide différent. Les doses requises de tétracycline sont, pour l'humain, au moins 300 fois moindres que les doses toxiques minimales [78]. Le système est spécifique. Aucun problème d'immunogénicité n'a été rapporté jusqu'à présent [82]. Les systèmes répondent aussi aux analogues de la tétracycline, telle la doxycycline. Cette dernière est jusqu'à 100 fois plus efficace que la tétracycline dans le système Tet-On [81].

II. II. IV. II : Désavantages

Quelques désavantages accompagnent ce système. Il peut y avoir un bruit de fond. Il faut alors observer plusieurs clones avant de trouver celui qui démontre un minimum d'expression basale et un maximum d'inductibilité. Ce bruit de fond peut varier de d'une cellule à l'autre, d'un type de cellule à l'autre ou d'un type de tissu à l'autre. Ceci implique une hétérogénéité dans l'ordre de grandeur du niveau d'induction de la transcription [83].

Les transactivateurs (tTA et rtTA) peuvent être toxiques pour certains types de cellules et peuvent aussi occasionner une inhibition de croissance lors de la culture cellulaire pour les cellules l'exprimant à haut niveau. La même situation peut se produire chez les animaux transgéniques : les cellules

comportant ce système peuvent avoir un désavantage de croissance par rapport aux autres [83].

Une répression de la transcription des gènes (rtTA, TA et le gène thérapeutique) par la chromatine est possible [84]. D'autre part, la tétracycline s'accumule dans le corps et le taux d'élimination est lent, ce qui pourrait interférer avec des inductions rapides et précises [85].

II. II. IV. III : Applications

Le système d'expression en fonction de la tétracycline a été employé jusqu'à présent pour diverses applications. Il est devenu populaire pour induire l'expression de gènes rapporteurs dans des cellules de mammifères [86, 87]. Par exemple, le système Tet-On a été utilisé en thérapie génique pour induire la transcription du gène POMC dans des cellules encapsulées introduites dans la colonne vertébrale chez le rat dans le but d'induire de l'analgésie [88]. À l'aide du système Tet-Off, d'autres chercheurs ont examiné les fonctions d'apprentissage et de mémoire médiées par les neurones hippocampaux avec le gène CaMKII α chez des souris transgéniques [89-91]. Le système Tet-On a été utilisé pour déterminer le rôle du gène ErbB2 dans le développement des épithéliums squameux et des follicules pileux chez des souris transgéniques [92].

III : LA CHIMIOPROTECTION

III. I : Introduction

Le développement de la résistance aux médicaments chez les cellules cancéreuses lors d'un traitement contre le cancer ne se produit pas chez les cellules saines normales du patient [2]. Pour plusieurs agents de chimiothérapie, la myélosuppression est un effet secondaire qui limite l'administration des doses élevées [93, 94].

Cette observation a mené plusieurs équipes de chercheurs à travailler sur le transfert de gènes de résistance dans des cellules souches hématopoïétiques [94]. Cette approche, la chimioprotection, a pour but de rendre les cellules souches hématopoïétiques résistantes aux médicaments antinéoplasiques. Les objectifs ultimes de cette stratégie sont a) la réduction de certains effets secondaires telle la myélosuppression ; b) l'augmentation de la dose de médicaments anticancéreux et c) l'amélioration du taux de survie des patients [2, 94].

Plusieurs gènes de résistance aux médicaments ont été clonés et exprimés (voir ci-dessous). Plusieurs aspects importants doivent cependant être considérés avant que la technologie de chimioprotection par la thérapie génique puisse être utilisée avec succès chez les patients : l'efficacité de transfert du gène, l'expression adéquate du gène transduit et la sécurité [2].

III. II : Exemples de chimioprotection

III. II. I : MDR1 (*multidrug resistance gene 1*)

Le gène MDR1 code pour une protéine transmembranaire, gp 170, qui agit comme une pompe [95, 96]. Cette P-glycoprotéine, dépendante de l'ATP [96], transporte hors de la cellule des composés lipophiles : des toxines polycycliques [95, 96] et des médicaments anticancéreux tels les anthracyclines, les alcaloïdes vinca, l'étoposide et le paclitaxel [96].

Une résistance a été observée contre ces agents chimiothérapeutiques chez des souris transgéniques dont les cellules de la moelle osseuse expriment l'ADNc de MDR1 [97-99]. D'autres souris, irradiées avec des doses létales et transplantées par ces cellules, ont été protégées contre une myélosuppression induite par la chimiothérapie [100]. De plus, des cellules souches

hématopoïétiques transduites avec l'ADNc du gène MDR1 à l'aide de vecteurs rétroviraux ont démontré une expression augmentée de ce gène [101-106]. Ces cellules ont démontré une résistance aux agents antinéoplasiques tel le taxol *in vitro*, et aussi *in vivo*, après une transplantation de moelle osseuse [102, 103, 105]. L'expression du MDR1 est accompagnée de résistance contre des médicaments antinéoplasiques dans des modèles murins *in vivo* [94]. Des essais cliniques ont été élaborés pour le cancer du sein [107]. Malheureusement, la surexpression du gène MDR1 pourrait mener à des effets secondaires telles la maladie myéloproliférative et les leucémies secondaires [108].

III. II. II : DHFR (*dihydrofolate reductase*)

L'enzyme DHFR est impliquée dans le mécanisme de biosynthèse *de novo* des purines et la synthèse de thymidylate [109]. Son substrat est le dihydrofolate et son cofacteur est le NADPH [110]. Elle est inhibée par l'agent antinéoplasique méthotrexate [109]. Cette inhibition a un effet antiprolifératif sur les tumeurs se divisant rapidement, mais aussi sur des tissus sains telles les cellules hématopoïétiques [111, 112].

Des formes variantes de DHFR ont été identifiées. Elles démontrent une affinité réduite envers le méthotrexate ; cependant, elles sont encore capables de se lier au dihydrofolate et au NADPH pour effectuer leurs activités normales. Ces variantes sont donc résistantes au méthotrexate [113].

Pour protéger les cellules souches hématopoïétiques contre les effets du méthotrexate, la thérapie génique à la DHFR (variante résistante au méthotrexate) a été utilisée en vue d'augmenter les doses de méthotrexate administrées au patient. Des souris transgéniques exprimant une DHFR résistante au méthotrexate ont été établies et des cellules de leur moelle osseuse ont été transplantées dans des souris irradiées de façon létale et les ont sauvées de doses létales de méthotrexate [114]. Le transfert rétroviral d'un gène DHFR

mutant dans des cellules souches de la moelle osseuse procure aussi une protection contre le méthotrexate chez des souris transplantées avec ces cellules [115].

III. II. III : MGMT (*O⁶-methylguanine DNA methyltransferase*)

Les agents alkylants nitrosourées, triazènes et tétrazènes ont aussi pour effet secondaire principal la myélosuppression. Ces agents antinéoplasiques forment plusieurs sortes d'adduits avec l'ADN, mais le dommage cytotoxique et mutagénique le plus fréquent est induit par une attaque à la position O⁶ de la guanine [116]. Des molécules telles la O⁶-méthylguanine [117] et la O⁶-chloroéthylguanine [118] sont formées. La résistance contre ces médicaments se fait principalement grâce aux enzymes de réparation de l'ADN [116].

La protéine O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransférase, codée par le gène MGMT, est l'enzyme principale impliquée dans la réparation de ces lésions sur l'ADN [116, 117, 120]. Cette enzyme transfère le groupe méthyle des lésions sur une de ses cystéines et laisse une guanine normale dans l'ADN [121, 122], et est inactivée de façon irréversible [122].

La chimiosensibilité des cellules de la moelle osseuse aux nitrosourées est causée par des niveaux bas d'alkyltransférase dans les cellules souches hématopoïétiques [123-125]. La surexpression du gène MGMT prévient les mutations G:C à A:T, diminue la transformation maligne des cellules et protège les animaux contre la tumorigénèse après un traitement avec un agent alkylant [94, 126-128]. L'expression du gène MGMT dans le foie de souris transgéniques traitées avec une nitrosourée a empêché la formation d'adduits de méthylguanine [129]. Des souris ayant des cellules thymiques surexprimant le gène MGMT ont démontré une protection contre le développement de lymphomes induits par les nitrosourées [130].

III. II. IV : CD (*cytidine deaminase*)

La CD est une enzyme qui catalyze la déamination de la cytidine, de la désoxycytidine [131, 132] et des analogues de la cytidine, tels les agents chimiothérapeutiques Ara-C, dFdC et 5-AZA-CdR, ce qui résulte en leur inactivation [131-135]. Ces analogues de la cytidine causent une myélosuppression. Cet événement est le facteur limitant pour administrer des doses élevées d'analogues de la cytidine [136-139].

Une résistance augmentée contre les médicaments Ara-C [132, 140], dFdC et 5-AZA-CdR [131] a été observée *in vitro* chez des fibroblastes murins ayant subi un transfert de l'ADNc de CD. De plus, une transduction de l'ADNc de ce gène dans des cellules murines de la moelle osseuse a conféré une protection *in vitro* contre l'Ara-C [132].

III. II. V : MT (méthallothionéines)

III. II. V. I : Biologie moléculaire et biochimie

Les méthallothionéines (MT) représentent une famille de protéines homologues. Chez l'humain, ces protéines sont encodées par 14 gènes situés sur un locus sur le chromosome 16 [141]. Ces gènes sont classés en quatre différents groupes (MT-I, MT-II, MT-III, MT-IV) [142-144]. Plusieurs gènes ont été séquencés, et leurs introns et leurs exons ont été identifiés [141, 145] ; la séquence du gène humain MT-Ia est celle qui nous intéresse présentement.

```

1 gaattcatgc ttggactaca gttcccgc acctcccca ttttgccttt tagtttaag
61 cagggtcagc acatcacatg aagtcattct ctttttaggg gatatcccac atgccaagac
121 taccaagcgg taggggggtg gccggctagg ctgtggggag cacggagatt tatttgcaaa
181 ggaggaccta gacaaaagag cccccacatc ctctcaggcg aggagaatgg acgagagtga
241 gaggccgacc cgtgttcccc tgttactgtg tacggagtag tgggtccgag ggacctaggt
301 gtggacaggg acaggcaagg cgacagcgag gagaaacgaa aatcacatcg gtggcggttg
361 ctctgcacac aaactccgct cgctaccgca cgctccacgc tctgcactac gccgaccggg
421 gacaggagca ggaggctgtg gctgcactca gacttcggga caggccgagc tgaaaaccgt
481 gagaggggtg ggtgggaggc gaccgaaacg ccaaggctgg gttcccggaa cgcgcgggga
541 ccaggggtgga aggcaacttc ggggaaacg gaaaggcgac cgggacctcg gggacgcccc
601 gtaccccggg cgtaaactca ctcccgcgtt agcgggcgcc aaagcgggga ggggggtgtc
661 ccgtgggtccg caccagggg agctcagtggt actgtgcgcc ttgccttct gctgcctaa
721 gccagtgcca ggtcatcacc tcgggcgggg cggactcggc tgggaggact cagcggggcg
781 ggcgaggcg cagggcgggt cctttgcgtc cggccctctt tcccctgacc ataaaagcag
841 ccgctggctg ctgggcccta ccaagccttc cacgtgcgcc ttatagctc tcaacttctt
901 gcttgggatc tccaacctca ccgoggctcg aaatggacc caactgctcc tgccgactg
961 gtaagggatg ctaggtttct ggtccttagg atacctattt ccccgccaca ggatagatgt
1021 ccctaggagt agagggtgtt tttgagttct agctaagtgg agtcatttat ttcattgatc
1081 tagtgctttt ccactcagcg ccttcatcat ccctagaaca ttcctattct aatgcctccc
1141 atctcgagag gcgagaggac tcaggctcat aattctctcg ctccatgtca cccaggtagt
1201 cggggactgc tagctgagcc ccagtactct gocagttcc tgggcggatg ggcgacacgg
1261 acttattggt ttttcgggat taaggacata agccatcct agcctctaca gatagaagta
1321 agattagctt catgtgcctt gagttggaca ggagctatct atcaggctcg gcaatgcaact
1381 cagctggcag catttgttga ccaactgctg ttatcttctg tgtaaagttc actgcctttt
1441 tctcttctt gcaggtggct cctgcacctg cactggctcc tgcaaatgca aagagtgcaa
1501 atgcaactcc tgcaagaaga gtgagtgctg ggccatctct aggaactggg gctgagccaa
1561 gtcagaggca ggaaaccaga gctgggctag gaggagttag ccaatgatcc atctccaca
1621 tcccttccca gcaactgatt caggatcaga gccagatctt tagacgtgat ggattcccaa
1681 gtttcgttct taaaatagac aaactgagcc caagagagtg caccaacctc ccaaacacaa
1741 acatgacacc taaggacttt cctcccctaa gtgtgtggtt ctggggagcc agccttctt
1801 tgctcttcta accccagtca ctgcctttcc agccttctgc caggtctggg gctcagatgg
1861 agataagctt ttcacagaag accctcactc gaaagatcca ccacttatct ccatctccg
1921 acagtgcctg ccatcctgaa ctaagtgtcc tctggggctg gggacagagc ttgggccagg
1981 cttctctggg ggcagggaa tcccggctca gtctagtctg acctctcaact ctccctctt
2041 cccagggctg ctgctcctgc tgccccatga gctgtgcca gtgtgcccag ggctgcatat
2101 gcaaaggggc atcagagaag tgacagctgct gtgcctgatg tccggacagc cctgctcgaa
2161 gatatagaaa gagtgacctg cacaaacttg gaattttttt tccatacaac cctgacccat
2221 ttactgtatt ttttttaatg aaatatgtga atgataataa aagttgctga cttaatgctg
2281 gctctgggtt tctttgtgtg ccttgaataa agggaccata caacagagct gggatgggtg
2341 attgcattga gagtcagaga cctgggtgct gggacctgtg gctattatct tacacactgg
2401 aggcctgtta aggcaaatca ggtactcgc tcaggtcagt ttcttaataa aaaatgtaag
2461 agcgtgatga cagatgatat aatgccacag gaatctgtca cagacttaag cttggtgtaag
2521 ataaaatcta ttagtatgac aaaaaaaaac accaaataca ttttttatat tgaacaggac
2581 aatttcagta aatatatgga agacaagata ggaaaaataa aattacacta cacatttggt
2641 ctggatgtat attcagactt ggaaacagtt cacagactgg cccagtatg tgggtcacac
2701 accttcaaca ccagccaaga catccccaca tggaaacctc agtcttggcc tgccaggctc
2761 actgatgtga tacttggtat ctctgagagc tccatgttgt gactgtctc tgaatctctg
2821 gaagtttctc cctaggtcat gctgaaatcc gttcctctc aagtccagcc cttggttaat
2881 tcaggcaagc aaagtgactg ggggagtggg ggaaattacc caggatcctc ccagcaagct
2941 g

```

Source : Richards RI, Heguy A, Karin M (1984) [145] ; numéro d'accèsion dans Genbank : K01383.

Figure 8. Séquence complète du gène MT-Ia. Les séquences des trois exons sont soulignées. L'exon 1 est situé aux bases 933 à 960, l'exon 2 aux bases 1455 à 1520 et l'exon 3 aux bases 2047 à 2138.

Chez les mammifères, la plupart des tissus expriment les deux isoformes MT-I et MT-II [142-144]. Les protéines MT ont un petit poids moléculaire, entre 6 et 7 kDA. Elles sont riches en cystéines [146, 147] et pauvres en acides aminés aromatiques et hydrophobiques [148]. Elles sont ubiquitaires et semblent impliquées dans la réponse cellulaire à l'exposition aux métaux [149-152]. Elles n'ont pas de fonction enzymatique connue [148].

Dans la cellule, les MT lient les métaux lourds: platine [153], zinc, cuivre, cadmium, mercure [146, 148, 154], cobalt, plomb, argent et or [148, 154], par des liens thiolate avec leurs cystéines [148]. Conséquemment, les MT retiennent des éléments importants au bon fonctionnement de la cellule et protègent la cellule contre le dommage que causeraient certains de ces métaux s'ils étaient libres [146]. Elles régulent la concentration intracellulaire d'ions métalliques libres, détoxifient et séquestrent les radicaux libres [142-144] tel l'oxyde nitrique [155]. Elles sont aussi impliquées dans le contrôle de l'embryogenèse, la croissance fœtale, le développement et la différenciation [142-144].

III. II. V. II : Résistance aux médicaments

Plusieurs expériences suggèrent un rôle potentiel des MT dans la résistance aux médicaments du groupe platine [156]. Les métallothionéines peuvent lier intra- et extra-cellulairement le cisplatine avec un lien covalent [146, 147], encore plus efficacement que la GSH [157]. Une molécule de métallothionéine peut lier environ 10 molécules de cisplatine [147]. Les métallothionéines lient le cisplatine l'inactivent par le fait même [158].

Des cellules murines C127 transfectées avec le gène MT-IIa ont démontré une résistance au cisplatine quatre fois plus grande que celle des cellules contrôles [159]. L'expression de la métallothionéine a été associée avec la résistance au cisplatine dans certains modèles, mais pas tous [159-161]. Des

expériences chez les souris et les rats ont démontré qu'une induction de la synthèse de la métallothionéine par du zinc protégeait la moelle osseuse et les poumons contre la toxicité du cisplatine [162, 163]. Une expression plus élevée de métallothionéine a été observée dans des tumeurs testiculaires résistantes au cisplatine [164]. Le cisplatine peut induire l'expression de la métallothionéine dans plusieurs lignées cellulaires telles des cellules de foie de souris [165] et certaines lignées cellulaires humaines de carcinome ovarien [161]. De la résistance a aussi été observée contre d'autres médicaments tels le cyclophosphamide [166] et le BBN [167].

OBJECTIFS

La chimiothérapie contre le cancer n'est pas toujours efficace. La myélosuppression, l'effet secondaire principal des médicaments antinéoplasiques, limite l'administration de doses élevées au patient. C'est le cas des médicaments du groupe platine [15, 55], utilisés dans le traitement de plusieurs types de cancers [8-12, 14].

L'objectif à long terme de notre étude est d'élaborer un protocole de thérapie génique pour protéger les cellules souches hématopoïétiques du patient contre les effets toxiques des médicaments du groupe platine. Un transfert de gène *ex vivo* dans les cellules souches hématopoïétiques suivi d'une greffe autologue de la moelle osseuse conférerait cette protection. **L'hypothèse de travail** est que l'expression élevée du gène MT protégera les cellules normales du patient contre les effets toxiques des médicaments du groupe platine. **Les objectifs à court terme** du projet de maîtrise ont été a) cloner le gène MT dans un vecteur lentiviral d'expression constitutive et dans un vecteur rétroviral d'expression dépendante de la tétracycline (système Tet-On) ; b) vérifier la capacité des plasmides recombinants de protéger des cellules en culture (BOSC23, A549 et DA-3) contre les agents du groupe platine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I : LIGNÉES CELLULAIRES

Nous avons utilisé les lignées cellulaires suivantes, provenant de l'ATCC (American Tissue Culture Collection, Manassas, VA) : A549 (carcinome pulmonaire humain) ; DA-3 (carcinome mammaire de souris) ; BOSC23 (cellules humaines embryonnaires rénales transformées).

Les cellules A549 et DA-3 ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Wisent Technologies, St-Bruno, Québec) et 1 mM de pyruvate de sodium (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Québec). Les cellules BOSC23 ont été maintenues dans du milieu Dubelcco modified essential medium (Life Technologies, Gaithersburg, MD), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Toutes les cellules ont été cultivées en monocouche dans des flacons de 25 cm² (Corning, New-York, NY), dans une atmosphère humidifiée, à 37 °C et à 5% de CO₂. Les cellules transfectées ont été cultivées dans le même milieu que les cellules correspondantes non-transfectées, mais leur sérum de veau fœtal (Tet System Approved Fetal Bovine Serum, Clontech, Palo Alto, CA) n'avait aucune trace de tétracycline ni de ses analogues.

II : CLONAGE ET PLASMIDES

II. I : Vecteur lentiviral

Nos travaux ont été effectués avec le gène MT-Ia (désigné dans ce texte sous le nom de MT), obtenu de E. Parisi (Istituto di Biochimica delle Proteine ed Enzimologia, Naples, Italie). Ce gène a été cloné dans le vecteur lentiviral pHR'CMV [65] pour obtenir le vecteur pHR'CMV-MT. Le gène MT a été

amplifié par PCR avec les amorces SP6 (5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3') et l'amorce MT1A-R-XHO qui introduisait un site de restriction XhoI (caractères gras) (5'-ATATAT**CTCGAG**ATATCTTCGAGCAGGGCTGT-3'). Les enzymes de restriction utilisées sont XhoI et BamHI (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

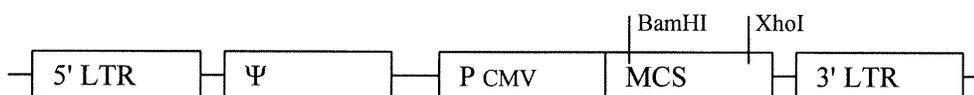


Figure 9. Séquences importantes entre les LTR 5' ET 3' du vecteur lentiviral pHR'CMV. Ce vecteur est dérivé du VIH. Il contient le signal d'encapsulation Ψ , un promoteur constitutif CMV et un site multiple de clonage. Le gène MT a été cloné dans le MCS.

II. II : Système Tet-On

Le gène MT et la cassette d'expression IRES-GFP ont été clonés dans le vecteur d'expression retroviral dépendant de la tétracycline pRev-TRE (Clontech, Palo Alto, CA), pour obtenir le plasmide recombinant pRev-TRE-MT, qui fait partie du système Tet-On. La cassette d'expression IRES-GFP a été obtenue de J. Galipeau (Lady Davis Institute, Université McGill, Montréal, Canada). Elle a été clonée à l'aide des enzymes de restriction Sal I (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Québec) et Cla (New England Biolabs, Mississauga, Ontario). Le gène MT a été amplifié par PCR avec la trousse HotStarTaq (Qiagen, Mississauga, Ontario), pour ajouter des sites de restriction Sal I (souligné) aux deux extrémités du gène MT et un site de restriction XhoI (caractères gras) à l'extrémité 5' du gène. Les deux amorces pour amplifier le gène MT sont les suivantes : MT-217 (5'-AAGCGT**CTCGAC**CTCGAGTACCA-CCATGGA-3') et MT-218 (5'-ACAGT**CTCGAC**GGACATCAGGCACAGCAG-C-3'). Le clonage du gène MT s'est fait à l'aide de l'enzyme de restriction Sal I.

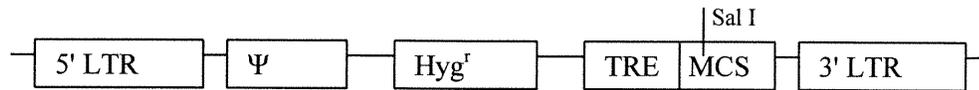


Figure 10. Séquences importantes entre les LTR 5' et 3' du plasmide rétroviral pRev-TRE. Ce vecteur est dérivé du rétrovirus *Moloney murine leukemia virus*. Il comprend le signal d'encapsidation Ψ , un gène de résistance à l'hygromycine et un site multiple de clonage sous le contrôle d'un promoteur, le TRE. Ce promoteur est constitué de sept séquences opératrices de l'opéron Tet, en amont d'un promoteur minimal CMV. Ce TRE peut être lié par la protéine chimérique rtTA lorsqu'elle est liée à de la tétracycline ou un de ses analogues, ce qui active la transcription du gène cloné dans le MCS. Le gène MT et la cassette d'expression IRES-GFP ont été clonés dans le MCS.

Le vecteur pRevTet-On (Clontech, Palo Alto, CA) a été utilisé tel quel.

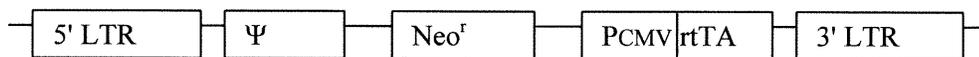


Figure 11. Séquences importantes entre les LTR 5' et 3' du plasmide pRevTet-On. Il s'agit d'un vecteur rétroviral dérivé du *Moloney murine leukemia virus* qui exprime la protéine rtTA. Le signal d'encapsidation Ψ et un gène de résistance au G418 sont aussi présents. Le promoteur constitutif stimule la transcription du gène rtTA.

Nous avons vérifié si le clonage s'était bien déroulé. Les plasmides pHR'CMV-MT et pRev-TRE-MT ont été digérés par des enzymes de restriction et la longueur des fragments obtenus a été observée sur gel d'agarose 2%. Les deux plasmides ont aussi été séquencés. Le vecteur lentiviral pHR'CMV-MT a été séquencé par la méthode de terminaison de chaîne avec des ddNTPs radioactifs (trousse Thermo Sequenase, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfé, Québec). L'amorce utilisée était MT1A-R-XHO. Le vecteur rétroviral pRev-TRE-MT a été séquencé par la compagnie Sequetech (Mountain View, CA) avec l'amorce MT-240 (5'-ACCAGGACCGATCCAGCC-3'), par la méthode de séquençage avec des ddNTPs fluorescents.

III : TRANSFECTIONS ET SÉLECTIONS

Les transfections stables et transitoires ont été effectuées avec le produit Superfect Transfection Reagent (Qiagen, Mississauga, Ontario). Les cellules ayant été transfectées avec un vecteur contenant le gène MT-1a sont désignées tout au long de ce texte par le suffixe MT. La sélection des cellules ayant subi une transfection stable s'est faite durant quatre à six semaines. Tous les clones obtenus ont été utilisés dans une population mixte.

Les cellules BOSC23 ont été transfectées de façon transitoire avec deux vecteurs lentiviraux, séparément : le pHR'CMV-LacZ (contrôle négatif) et le pHR'CMV-MT. Environ 48 heures après les transfections transitoires, les cellules ont été soumises à un essai clonogénique (expliqué plus loin).

Les cellules A549 et DA-3 ont été transfectées premièrement avec le plasmide pRevTet-On, qui détient le gène de sélection neo^r. Nous avons sélectionné les cellules DA-3 transfectées avec 200 µg/ml de G418 (Clontech, Palo Alto, CA) et les cellules A549 transfectées avec 600 µg/ml de G418. Elles ont subi ensuite une seconde transfection avec le plasmide pRev-TRE-MT, qui contient le gène de résistance à l'hygromycine. Les cellules A549 ont été sélectionnées avec 200 µg/ml d'hygromycine B (Sigma, St-Louis, MO), et les cellules DA-3 avec 100 µg/ml d'hygromycine B. La présence de MT dans les cellules A549 et DA-3 a été vérifiée par PCR avec les amorces MT-217 et MT-218. L'extraction de l'ADN de ces cellules pour le PCR s'est faite avec la trousse DNeasy de Qiagen (Mississauga, Ontario).

V : ESSAIS CYTOTOXIQUES

V. I : Essai clonogénique

Ce type d'essai est typiquement exécuté pour déterminer un nombre ou une proportion de cellules encore capables de générer des colonies après une

exposition aux médicaments. Pour les cellules BOSC23, BOSC23-LacZ et BOSC23-MT, un million de cellules (dans un millilitre) ont été déposées dans des puits de 35 millimètres de diamètre (confluence : 30 pour cent). Différentes quantités de carboplatine ont été ajoutées. Après une incubation de 72 heures, le milieu contenant les cellules mortes et les médicaments a été aspiré et remplacé par du milieu frais. Ce remplacement a été répété tous les deux ou trois jours, jusqu'à l'observation de colonies (environ deux semaines).

Pour les cellules A549, A549-MT, DA3 et DA-3-MT, 100 cellules (dans un millilitre) ont été mises dans des puits de 16 millimètres de diamètre avec diverses concentrations de doxycycline et incubées à 37 °C. Environ 24 heures plus tard, différentes concentrations de cisplatine et de carboplatine ont été appliquées dans les puits. Chaque concentration était répétée quatre fois par expérience. Après 72 heures d'incubation à 37 °C, le milieu contenant les médicaments a été aspiré et remplacé par du milieu frais. Lorsque du bleu de méthylène était appliqué dans les puits, nous pouvions observer à l'œil nu des colonies après environ 10 jours d'incubation à 37 °C. Une colonie représente environ 1000 cellules. Le nombre de colonies observées aux concentrations nulles des médicaments correspondait à 0% de perte de clonogénicité.

V. II : Essai d'inhibition de croissance

L'essai de microculture au tétrazolium (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide*), ou essai MTT, permet d'évaluer la proportion de cellules vivantes après une exposition aux médicaments. Cet essai est colorimétrique : il est basé sur l'habileté des cellules vivantes à réduire le sel jaune MTT en un précipité pourpre [168]. Nous comparons la croissance des cellules en présence des médicaments à base de platine avec la croissance des cellules en l'absence de ces médicaments.

Les médicaments utilisés, le cisplatine et le carboplatine, ont été gracieusement donnés par la pharmacie de l'Hôpital Sainte-Justine. Ils ont été dilués dans une solution PBS à une concentration de 1 mM et conservés à 4 °C et à la température de la pièce, respectivement. La doxycycline (Sigma, St-Louis, MO) a été dissoute dans du PBS ou de l'eau à une concentration stock de 10 mg/ml et des aliquots ont été congelés à -20 °C.

Pour l'essai MTT [168], 50 µl d'une suspension de 40 000 cellules/ml ont été disposés dans des plateaux de 96 puits, avec diverses concentrations de doxycycline. De 18 à 20 heures plus tard, ces cellules ont été exposées à 50 µl de cisplatine ou de carboplatine dissout dans du milieu de culture, de diverses concentrations, avec les mêmes concentrations de doxycycline que la veille. Chaque concentration était représentée huit fois sur les cellules. Après une incubation à 37 °C de 96 heures, 20 µl d'une solution MTT (Sigma, St-Louis, MO) de 2.5 mg/ml ont été ajoutés. Les cellules encore vivantes possèdent une déhydrogénase mitochondriale qui transforme le MTT, un sel de tétrazolium jaune, en un cristal de formazan pourpre. Une solution tampon dissolvante de ce cristal a été ajoutée après quatre heures d'incubation à 37 °C. Après une incubation à 37 °C jusqu'au lendemain, les plaques ont été lues par un lecteur ELISA (absorbance : 570 nm ; référence : 630 nm) qui détermine une absorbance proportionnelle au nombre de cellules encore vivantes. L'absorbance obtenue pour les cellules exposées à une concentration nulle représente 0% de mort cellulaire.

VI : RT-PCR SEMI-QUANTITATIF

La quantité relative d'ARN messager du gène MT produite par les cellules après différents temps d'exposition à la doxycycline a été étudiée. Les cellules A549-MT et DA-3-MT ont été exposées durant différents temps à une concentration de doxycycline de 1 µg/ml : 0, 24, 48, et 72 heures. L'ARN total

de ces cellules et aussi des cellules A549 et DA-3 a été isolé avec la trousse RNeasy de Qiagen (Mississauga, Ontario). L'ARN total a ensuite été mis en contact avec de la DNase I (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfé, Québec), au cours d'une incubation de 30 à 40 minutes à 37 °C, pour empêcher une contamination par l'ADN génomique. Nous avons ensuite inactivé la DNase I par une incubation à 75 °C de trois à cinq minutes. La transcription inverse s'est faite avec la trousse Omniscript Reverse Transcriptase Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario), en utilisant des hexamères (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Québec) en tant qu'amorces.

Un PCR a ensuite été effectué sur la matrice de l'ADNc pour amplifier certains gènes. Pour les cellules A549 et A549-MT, nous avons amplifié par PCR le gène MT et le gène de la microglobuline comme contrôle interne. Les amorces pour le gène MT sont MT-217 et MT-218 ; la grandeur du fragment obtenu est de 223 paires de bases. Les amorces pour le gène microglobuline sont RLM-23 (5'-CTCGCGCTACTCTCTTTCTGG-3') et RLM-24 (5'-GC-TTACATGTCTCGATCCCACTTAA-3') ; la grandeur du fragment obtenu est de 335 paires de bases. Pour les cellules DA-3 et DA-3-MT, le PCR a été utilisé pour amplifier le gène MT et le gène GPDH (contrôle interne). Nous avons choisi les amorces MT-217 et le MT-218 (gène MT) et GPDH-264 (5'-CATGTTCCAGTATGACTCCAC-3') et GPDH-265 (5'-ACTCCACGACAT-ACTCAGCA-3') (gène GPDH, 158 paires de bases).

Les fragments obtenus ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2% et détectés avec du Gel Star (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME). Pour évaluer les quantités relatives d'ARN du transgène MT, nous avons d'abord établi les contrôles internes à une même intensité sur le gel d'agarose. La quantité d'ADNc utilisée pour amplifier le gène MT est la même que celle utilisée pour les contrôles internes. Les comparaisons

d'intensité ont été réalisées dans la phase exponentielle de l'amplification par PCR.

VII : ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats des essais cytotoxiques et des essais clonogéniques sur les cellules A549, A549-MT, DA-3 et DA-3-MT ont été compilés à l'aide du programme informatique SPSS, version 10.0 pour Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). La valeur de P correspondant à la comparaison de la clonogénicité selon différentes conditions expérimentales a été calculée en effectuant une régression linéaire.

RÉSULTATS

I : LENTIVIRUS

I. I : Plasmides

Afin d'obtenir une preuve que le transgène MT avait réellement un effet protecteur potentiel contre les médicaments du groupe platine, nous avons choisi de cloner le gène MT dans un vecteur lentiviral d'expression constitutive, puis de le transférer de façon transitoire dans des cellules BOSC23. La transfection transitoire permet, en plus de vérifier si le vecteur lentiviral contenant le gène MT est fonctionnel, d'évaluer plus facilement et plus rapidement l'effet du transgène que la transfection stable. En effet, plusieurs copies du transgène entrent dans la cellule transfectée transitoirement, occasionnant une grande expression du transgène dans cette cellule, contrairement aux transfusions stables qui permettent habituellement l'insertion d'une seule copie du transgène par cellule.

Le vecteur lentiviral utilisé dans nos expériences était dérivé du VIH. Pour préparer des lentivirus, nous avons besoin d'une lignée cellulaire d'encapsulation particulière, qui n'aurait causé aucun risque de produire des particules virales de type sauvage, et de deux autres plasmides (co-transfection). Cette lignée cellulaire ne nous était pas disponible à ce moment et nous avons donc procédé à des transfusions transitoires avec un plasmide seulement.

Nous avons cloné le gène MT dans le plasmide pHR'CMV-LacZ pour obtenir la construction pHR'CMV-MT. Pour vérifier si le clonage avait bien été effectué, l'ADNc du gène entier a été séquencé et concordait avec sa version originale. Les deux plasmides ont été transférés séparément de façon transitoire dans des cellules BOSC23.

ACCACC

	M	N	P	N	C	S	C	A	T	G
1	ATG	GAT	CCC	AAC	TGC	TCC	TGC	GCC	ACT	GGT
	G	S	C	S	C	T	G	S	C	K
31	GGC	TCC	TGC	TCC	TGC	ACT	GGC	TCC	TGC	AAA
	C	K	E	C	K	C	N	S	C	K
61	TGC	AAA	GAG	TGC	AAA	TGC	AAC	TCC	TGC	AAG
	K	S	C	C	S	C	C	P	M	S
91	AAG	AGC	TGC	TGC	TCC	TGC	TGC	CCC	ATG	AGC
	C	A	K	C	A	K	G	C	I	C
121	TGT	GCC	AAG	TGT	GCC	AAG	GGC	TGC	ATC	TGC
	K	G	A	S	E	K	C	S	C	C
151	AAA	GGG	GCA	TCA	GAG	AAG	TGC	AGC	TGC	TGT
	A	.								
181	GCC	TGA	TGTCCGGACAGCCCTGCTCGAAGATAT							

Figure 12. Séquence de l'ADNc et séquence prédite des acides aminés du gène MT. Les nucléotides des régions 5' et 3' non-traduites sont écrits en caractères plus petits. Les nucléotides sont numérotés à partir du premier nucléotide dans la région traduite. Les 20 cystéines, éléments importants pour lier les métaux lourds, sont indiquées en caractères gras.

I. II : Essai clonogénique

Nous avons soumis les cellules BOSC23, BOSC23-LacZ et BOSC23-MT transfectées transitoirement à un essai clonogénique pour déterminer si l'expression du gène MT pouvait protéger la clonogénicité de cellules en culture contre la carboplatine. Le tableau I indique que les cellules BOSC23-MT (non-clonées) étaient plus résistantes que les cellules n'ayant pas été transfectées avec ce gène, aux concentrations de 200 et 600 μ M de carboplatine. De plus, les colonies de cellules BOSC23-MT observées étaient plus grosses que les colonies de cellules BOSC23 et BOSC23-LacZ. La figure 12 présente des photos de colonies observées à 600 μ M.

TABLEAU I : COLONIES DÉVELOPPÉES APRÈS
UNE EXPOSITION AU CARBOPLATINE¹

Concentration (μM)	BOSC23	BOSC23-LacZ	BOSC23-MT
20	90%	80%	90%
200	28	3	255
600	0	0	80
2000	0	0	0

n=1

¹ Il n'était pas possible d'évaluer, à la concentration de 20 μM , le nombre de colonies car la confluence était trop forte. Le pourcentage de confluence a donc été estimé. Aux autres concentrations, le nombre de colonies observées dans les puits est indiqué.

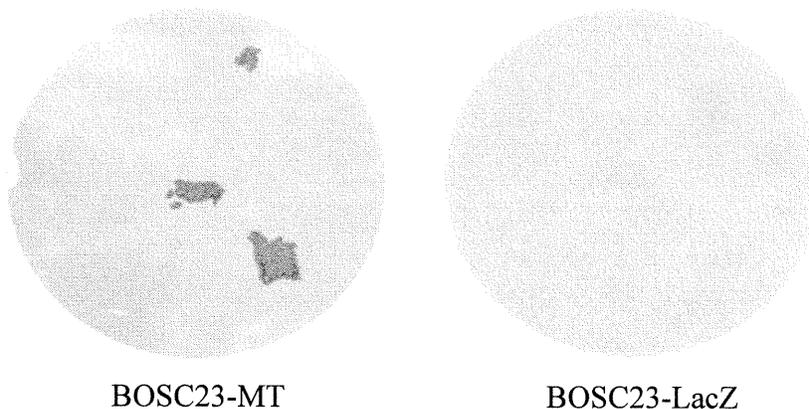


Figure 13. Photos de colonies observées à 600 μM lors d'un essai clonogénique sur les cellules BOSC23, BOSC23-LacZ et BOSC23-MT. Les cellules BOSC23, BOSC23-LacZ et BOSC-MT ont été exposées durant 72 heures à diverses concentrations de carboplatine, puis incubées à 37 °C pour deux semaines. À une concentration de 600 μM de carboplatine, les cellules BOSC23-LacZ étaient toutes mortes (photo de droite). Les cellules BOSC23-MT ont développé 80 colonies (photo de gauche : pour plus de clarté dans l'illustration, trois de ces colonies seulement sont présentées).

II : SYSTÈME RÉTROVIRAL TET-ON

II. I : Plasmides

Nous avons ensuite voulu déterminer le potentiel du transgène MT de protéger des cellules contre les effets du cisplatine ou du carboplatine dans un contexte de thérapie génique, en l'occurrence celui du système Tet-On. Nous avons cloné le gène MT et la cassette d'expression IRES-GFP dans le vecteur pRev-TRE. Le clonage du gène MT a été confirmé par séquençage ; le chromatogramme de la séquence est présenté en annexe. Nous avons ensuite transfecté séquentiellement et de façon stable les deux vecteurs rétroviraux dans des lignées cellulaires. Si les résultats des essais cytotoxiques subséquents avaient été encourageants, nous aurions ensuite procédé à des transductions. Nous avons choisi la transfection stable comme première étape, car celle-ci est plus simple, plus facile et plus rapide qu'une transduction. Il est difficile d'optimiser les conditions de la transduction rétrovirale ; le titre du virus et le niveau d'expression sont bas [64].

Nous n'avons pas l'intention d'effectuer des infections de cellules avec des rétrovirus. L'infection consiste en l'utilisation d'une particule virale capable de se répliquer dans une cellule cible. Les rétrovirus que nous avons prévu préparer auraient été incapables de se répliquer, donc la transduction (et non l'infection) des cellules aurait été possible seulement.

Le plasmide pRevTet-On a été transfecté de façon stable dans les cellules A549 et DA-3. Après une sélection au G418, les cellules ont subi une autre transfection stable avec le plasmide pRev-TRE-MT. Ces cellules ont ensuite été sélectionnées à l'hygromycine B. La présence du transgène MT dans ces cellules a été vérifiée par PCR.

II. II : RT-PCR semi-quantitatif

Pour vérifier si le système Tet-On fonctionnait dans les cellules utilisées après les transfections, les cellules DA-3-MT et A549-MT ont été soumises à un traitement de 1 µg/ml de doxycycline, pour différentes longueurs de temps. L'ARN messager du transgène MT de ces cellules a été comparé à celui des cellules correspondantes non-transfectées, à l'aide de la méthode de RT-PCR semi-quantitatif.

La figure 13 indique que pour les cellules A549-MT, il y a une induction similaire de la synthèse d'ARN messager du transgène MT à 24, 48 et 72 heures d'exposition à la doxycycline. En effet, une bande d'intensité semblable est visible pour ces trois différents temps d'exposition, alors que nous ne décelons aucun signal pour les cellules A549 et A549-MT n'ayant pas été en présence de doxycycline.

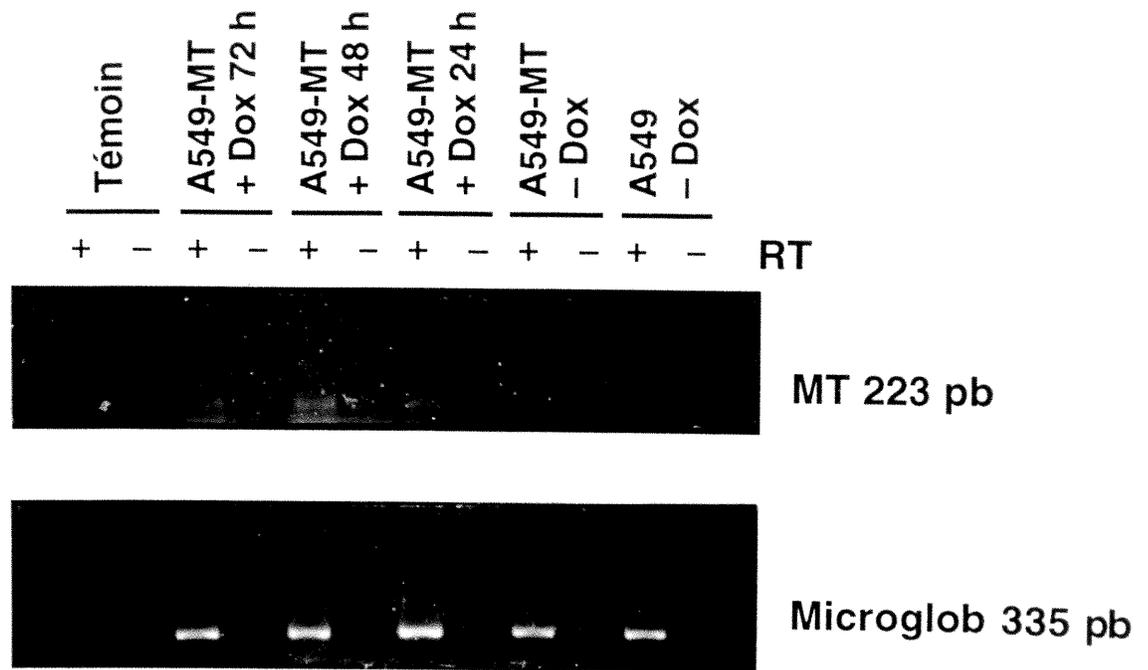


Figure 14. Analyse par RT-PCR semi-quantitatif de l'activation de l'expression du transgène MT par la doxycycline, sur les cellules A549 et A549-MT. L'ARN total des cellules A549 et A549-MT après 0, 24, 48 et 72 heures de traitement à 1 μ g/ml de doxycycline a été isolé. De l'ADNc a été produit à l'aide d'une réaction de transcriptase inverse. Un PCR a été effectué sur l'ADNc obtenu, avec des amorces spécifiques pour le transgène MT et le gène microglobuline. L'ADNc amplifié est présenté sur un gel d'agarose. L'ARN messager du transgène MT est produit en quantité comparable dans les cellules transfectées à 24, 48 et 72 heures, alors qu'il est non-détectable chez les cellules A549 et A549-MT non-exposées à la doxycycline.

Nous constatons, pour 24 heures d'exposition à la doxycycline, une augmentation de l'induction de la synthèse d'ARN messager du transgène MT pour les cellules DA-3-MT. Effectivement, sur la figure 14, pour les cellules DA-3-MT ayant été en contact avec de la doxycycline durant 24 heures, une bande de forte intensité se distingue des autres bandes ; 48 et 72 heures

d'exposition à la doxycycline induisent moins la synthèse d'ARN messenger que 24 heures d'exposition. De l'ARN messenger est aussi produit par les cellules DA-3-MT n'ayant pas été stimulées par de la doxycycline. L'intensité de la bande observée pour ces cellules est analogue aux bandes observées pour 48 et 72 heures d'exposition à la doxycycline.

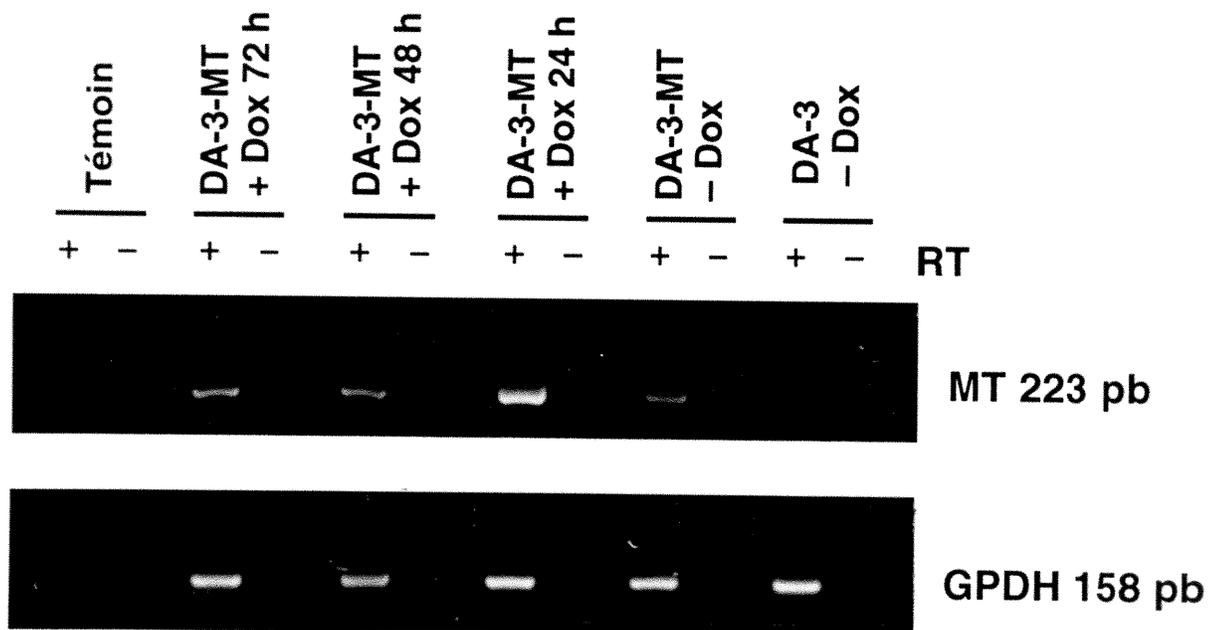


Figure 15. Analyse par RT-PCR semi-quantitatif de l'activation de l'expression du transgène MT par la doxycycline, sur les cellules DA-3 et DA-3-MT. L'ARN total des cellules DA-3 et DA-3-MT après 0, 24, 48 et 72 heures de traitement à 1 µg/ml de doxycycline a été isolé. Nous avons ensuite effectué une transcription inverse de l'ARN total. Un PCR sur l'ADNc obtenu a été réalisé avec des amorces spécifiques pour le transgène MT et GPDH. L'ADNc amplifié est présenté sur un gel d'agarose. Une augmentation d'ARN messenger du transgène MT est visible surtout à 24 heures mais aussi de façon moins importante aux autres temps dans les cellules DA-3-MT. L'ARN messenger n'est pas observable dans les cellules DA-3 non-exposées à la doxycycline.

II. III : Essais clonogéniques

Nous avons soumis les cellules A549, A549-MT, DA-3 et DA-3-MT à des essais clonogéniques, afin d'observer si les cellules transfectées démontraient une plus haute clonogénicité que les cellules non-transfectées, lors d'une exposition au cisplatine et au carboplatine. Afin d'induire la synthèse du transgène MT, nous avons ajouté de la doxycycline aux cellules transfectées avant leur exposition aux médicaments à base de platine. Plusieurs conditions d'induction ont été essayées, pour déterminer si une circonstance était meilleure qu'une autre.

Les résultats concernant la capacité des cellules de générer des colonies après une exposition à un médicament à base de platine sont présentés dans les tableaux II, III, IV et V. Les temps d'exposition des cellules à la doxycycline avant l'addition des médicaments et la concentration de doxycycline y sont indiqués. Les données des tableaux représentent des valeurs moyennes \pm SD. Le tableau II indique que le carboplatine semble empêcher similairement ou plus fortement la formation de colonies des cellules A549-MT, induites ou non par la doxycycline, par rapport aux cellules contrôles A549. Le tableau III démontre que le cisplatine, sur le même type de cellules, a un effet analogue à celui du carboplatine. Quant aux cellules DA-3-MT, comparativement aux cellules contrôles DA-3, elles semblent plus sensibles à l'influence du carboplatine et du cisplatine, tel que montré dans les tableaux IV et V, respectivement.

TABLEAU II : EFFET DU CARBOPLATINE SUR LA CLONOGÉNÉICITÉ DES CELLULES A549 ET A549-MT

Carboplatine (μM)	Perte de clonogénicité (%)				
	A549 (Réf)	A549-MT	A549-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$ 24 h	A549-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$ 48 h	A549-MT Dox 3 $\mu\text{g/ml}$ 24 h
0	0	0	0	0	0
2	10.0 \pm 3.3	15.3 \pm 12.5	16.5 \pm 15.5	47.6 \pm 54.5	10.2 \pm 7.1
4	12.0 \pm 6.1	29.9 \pm 13.4	27.7 \pm 7.2	22.5 \pm 6.0	33.8 \pm 20.2
10	36.2 \pm 12.5	92.0 \pm 3.2	94.9 \pm 2.3	89.4 \pm 4.5	97.5 \pm 3.6
20	94.0 \pm 3.3	99.9 \pm 0.3	99.7 \pm 0.5	100 \pm 0	100 \pm 0
P ¹		<.0005	<.0005	<.0005	<.0005

n = 2-4

¹ Valeurs de P pour les comparaisons de chacun des groupes A549-MT *versus* le groupe de référence, dans un modèle incluant la dose de carboplatine.

TABLEAU III : EFFET DU CISPLATINE SUR LA CLONOGÉNÉICITÉ DES CELLULES A549 ET A549-MT

Cisplatine (μM)	Perte de clonogénicité (%)				
	A549 (Réf)	A549-MT	A549-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$ 24 h	A549-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$ 48 h	A549-MT Dox 3 $\mu\text{g/ml}$ 24 h
0	0	0	0	0	0
0.1	12.0 \pm 8.0	9.58 \pm 6.78	20.0 \pm 16.2	9.57 \pm 5.28	1.65 \pm 22.3
1	16.7 \pm 12.3	34.3 \pm 10.4	69.5 \pm 27.3	31.3 \pm 3.5	47.6 \pm 22.3
3	55.9 \pm 12.0	94.2 \pm 4.9	99.1 \pm 1.3	89.6 \pm 8.4	95.1 \pm 2.4
4	77.0 \pm 10.7	99.0 \pm 1.4	100 \pm 0	98.3 \pm 2.5	100 \pm 0
P ¹		<.0005	<.0005	<.0005	<.0005

n = 2-4

¹ Valeurs de P pour les comparaisons de chacun des groupes A549-MT *versus* le groupe de référence, dans un modèle incluant la dose de cisplatine.

TABLEAU IV : EFFET DU CARBOPLATINE SUR LA CLONOGENICITE DES CELLULES DA-3 ET DA-3-MT

Carboplatine (μM)	Perte de clonogénicité (%)				
	DA-3 (Réf)	DA-3-MT	DA-3-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$ 24 h	DA-3-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$ 48 h	DA-3-MT Dox 3 $\mu\text{g/ml}$ 24 h
0	0	0	0	0	0
2.5	10.3 \pm 1.4	91.6 \pm 8.3	91.1 \pm 3.8	50.8 \pm 49.4	85.8 \pm 17.4
5	34.1 \pm 18.7	99.1 \pm 1.1	100 \pm 0	63.7 \pm 50.6	100 \pm 0
10	80.7 \pm 5.2	99.3 \pm 1.3	100 \pm 0	99.3 \pm 0.0	98.0 \pm 2.9
20	98.4 \pm 0.9	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	99.0 \pm 1.4
P ¹		<.0005	<.0005	<.0005	<.0005

n = 2-3

¹ Valeurs de P pour les comparaisons de chacun des groupes DA-3-MT *versus* le groupe de référence, dans un modèle incluant la dose de carboplatine.

TABLEAU V : EFFET DU CISPLATINE SUR LA CLONOGENICITE DES CELLULES DA-3 ET DA-3-MT

Cisplatine (μM)	Perte de clonogénicité (%)				
	DA-3 (Réf)	DA-3-MT	DA-3-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$ 24 h	DA-3-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$ 48 h	DA-3-MT Dox 3 $\mu\text{g/ml}$ 24 h
0	0	0	0	0	0
0.1	11.9 \pm 4.3	45.3 \pm 29.1	36.7 \pm 7.4	11.2 \pm 15.8	26.6 \pm 28.8
0.3	31.6 \pm 7.6	95.8 \pm 3.7	96.3 \pm 2.1	45.2 \pm 57.5	98.4 \pm 2.3
0.6	49.6 \pm 5.5	99.8 \pm 0.3	99.8 \pm 0.4	62.2 \pm 53.5	100 \pm 0
1	58.2 \pm 6.0	99.8 \pm 0.3	98.7 \pm 1.2	54.3 \pm 62.7	100 \pm 0
P ¹		<.0005	<.0005	<.0005	<.0005

n = 2-3

¹ Valeurs de P pour les comparaisons de chacun des groupes DA-3-MT *versus* le groupe de référence, dans un modèle incluant la dose de cisplatine.

La figure 15 illustre un résultat particulier, mais qui représente la situation générale observée dans les tableaux II à V. Il s'agit de la comparaison

d'une courbe de perte de clonogénicité des cellules DA-3 et DA-3-MT (24 heures d'exposition à 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxycycline, avant l'ajout des médicaments). Les données des tableaux représentent des valeurs moyennes \pm SD. Les cellules DA-3-MT ont une perte de clonogénicité plus prononcée que les cellules DA-3 sous l'influence du cisplatine.

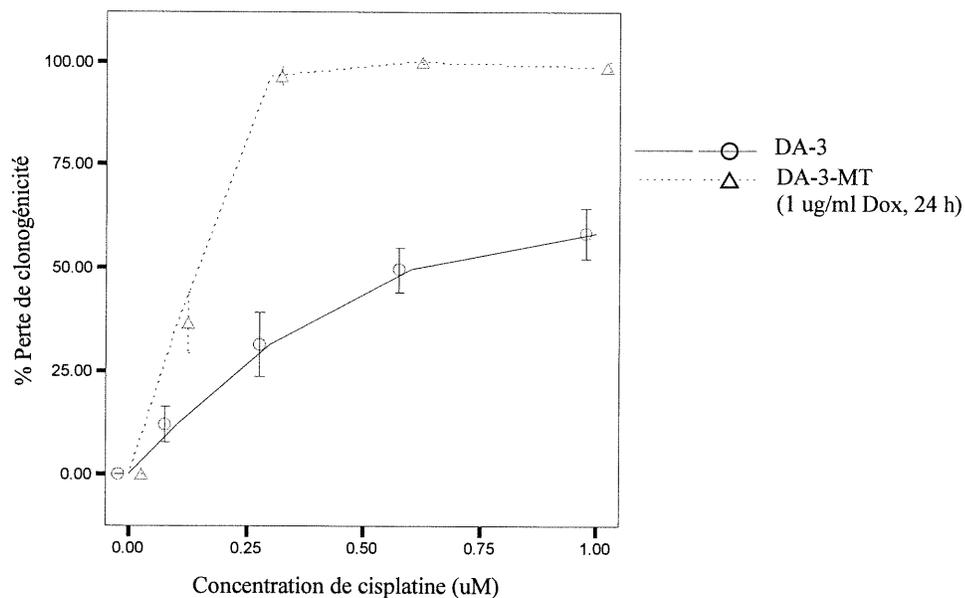


Figure 16. Effet du cisplatine sur la clonogénicité des cellules DA-3 et DA-3-MT. Nous avons exposé ces cellules à différentes concentrations de cisplatine durant 72 heures. Les colonies développées ont été comptées après leur développement. Les cellules DA-3-MT ont été stimulées avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxycycline 24 heures avant l'exposition au cisplatine. Ces cellules ont une clonogénicité réduite comparativement aux cellules DA-3. Cette situation est représentative de la plupart des essais clonogéniques effectués. Dans d'autres cas, la clonogénicité des cellules transfectées était similaire à celle des cellules non-transfectées.

Les cellules A549 et DA-3 transfectées avec le gène MT ne semblent pas être plus résistantes au cisplatine ni au carboplatine en terme de

clonogénicité. Dans la plupart des cas, elles semblent même y être plus sensibles.

VI : Essais d'inhibition de croissance

Les cellules A-549, A549-MT, DA-3 et DA-3-MT ont été soumises à des essais MTT (essais d'inhibition de croissance) avec le cisplatine et le carboplatine, dans le but d'estimer le pourcentage de cellules mortes après une exposition à ces médicaments. Nous avons traité les cellules transfectées avec des concentrations différentes de doxycycline, 24 heures avant leur exposition aux médicaments à base de platine.

Les tableaux VI, VII, VIII et IX comprennent les résultats obtenus. Le tableau VI indique que la mortalité des cellules A549-MT, induites ou non par la doxycycline, est similaire ou légèrement supérieure à celle des cellules A549 sous l'action du carboplatine. On observe le même événement lorsque le même type de cellules se retrouve en présence du cisplatine, tel que démontré dans le tableau VII. Les cellules DA-3-MT meurent en plus grande proportion que les cellules DA-3 en conséquence d'une exposition au carboplatine, comme le prouve le tableau VIII. On peut voir le même phénomène avec l'ajout de cisplatine sur les mêmes catégories de cellules, tel qu'indiqué dans le tableau IX.

TABLEAU VI : EFFET DU CARBOPLATINE SUR LA MORTALITÉ DES CELLULES A549 ET A549-MT

Carboplatine (μM)	Mort cellulaire (%)			
	A549 (Réf)	A549-MT	A549-MT Dox 10 ng/ml	A549-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$
0	0	0	0	0
75	18.5 \pm 8.2	26.9 \pm 20.8	21.8 \pm 10.5	40.3 \pm 26.6
100	31.1 \pm 24.3	38.0 \pm 27.4	35.3 \pm 22.4	51.8 \pm 34.1
150	54.8 \pm 34.6	67.2 \pm 37.7	59.2 \pm 39.0	72.9 \pm 42.1
200	89.7 \pm 16.5	94.0 \pm 10.5	89.4 \pm 18.4	88.7 \pm 19.6
P ¹		<.0005	<.0005	<.0005

n = 3

¹ Valeurs de P pour les comparaisons de chacun des groupes A549-MT *versus* le groupe de référence, dans un modèle incluant la dose de carboplatine.

TABLEAU VII : EFFET DU CISPLATINE SUR LA MORTALITÉ DES CELLULES A549 ET A549-MT

Cisplatine (μM)	Mort cellulaire (%)			
	A549 (Réf)	A549-MT	A549-MT Dox 10 ng/ml	A549-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$
0	0	0	0	0
1	8.77 \pm 7.84	5.83 \pm 5.09	7.61 \pm 7.41	5.65 \pm 5.19
5	11.1 \pm 1.5	28.2 \pm 6.7	20.4 \pm 2.1	26.1 \pm 8.9
10	27.1 \pm 11.9	42.7 \pm 5.2	31.8 \pm 8.2	38.7 \pm 13.6
20	51.3 \pm 21.8	65.7 \pm 8.8	57.4 \pm 8.2	65.5 \pm 16.8
30	66.3 \pm 21.8	84.7 \pm 0.6	75.6 \pm 3.7	82.9 \pm 11.3
P ¹		<.0005	<.0005	<.0005

n = 3

¹ Valeurs de P pour les comparaisons de chacun des groupes A549-MT *versus* le groupe de référence, dans un modèle incluant la dose de cisplatine.

TABLEAU VIII : EFFET DU CARBOPLATINE SUR LA MORTALITÉ DES CELLULES DA-3 ET DA-3-MT

Carboplatine (μM)	Mort cellulaire (%)			
	DA-3 (Réf)	DA-3-MT	DA-3-MT Dox 10 ng/ml	DA-3-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$
0	0	0	0	0
20	6.12 \pm 6.94	95.8 \pm 3.8	96.3 \pm 2.9	95.9 \pm 3.5
30	10.8 \pm 8.7	99.5 \pm 1.0	100 \pm 0	99.6 \pm 0.8
40	9.72 \pm 10.88	100 \pm 0	100 \pm 0	99.7 \pm 0.6
50	21.5 \pm 8.2	100 \pm 0	100 \pm 0	99.9 \pm 0.2
P ¹		<.0005	<.0005	<.0005

n = 4

¹ Valeurs de P pour les comparaisons de chacun des groupes DA-3-MT *versus* le groupe de référence, dans un modèle incluant la dose de carboplatine.

TABLEAU IX : EFFET DU CISPLATINE SUR LA MORTALITÉ DES CELLULES DA-3 ET DA-3-MT

Cisplatine (μM)	Mort cellulaire (%)			
	DA-3 (Réf)	DA-3-MT	DA-3-MT Dox 10 ng/ml	DA-3-MT Dox 1 $\mu\text{g/ml}$
0	0	0	0	0
1	5.75 \pm 4.08	69.1 \pm 21.7	71.9 \pm 20.7	70.4 \pm 20.6
5	11.8 \pm 6.5	95.6 \pm 4.6	94.9 \pm 5.2	94.3 \pm 6.0
8	16.1 \pm 17.0	99.9 \pm 0.2	98.6 \pm 0.5	99.7 \pm 0.7
10	30.6 \pm 20.5	99.8 \pm 0.2	99.5 \pm 1.1	99.6 \pm 0.9
P ¹		<.0005	<.0005	<.0005

n = 4

¹ Valeurs de P pour les comparaisons de chacun des groupes DA-3-MT *versus* le groupe de référence, dans un modèle incluant la dose de cisplatine.

La figure 16 illustre un cas particulier, représentatif de la situation générale. Il s'agit de la comparaison d'une courbe de mortalité des cellules DA-

3 et DA-3-MT (1 $\mu\text{g/ml}$ de doxycycline, 24 heures avant l'ajout du cisplatine). Les cellules DA-3-MT meurent plus que les cellules DA-3 lorsqu'elles sont en contact avec du cisplatine.

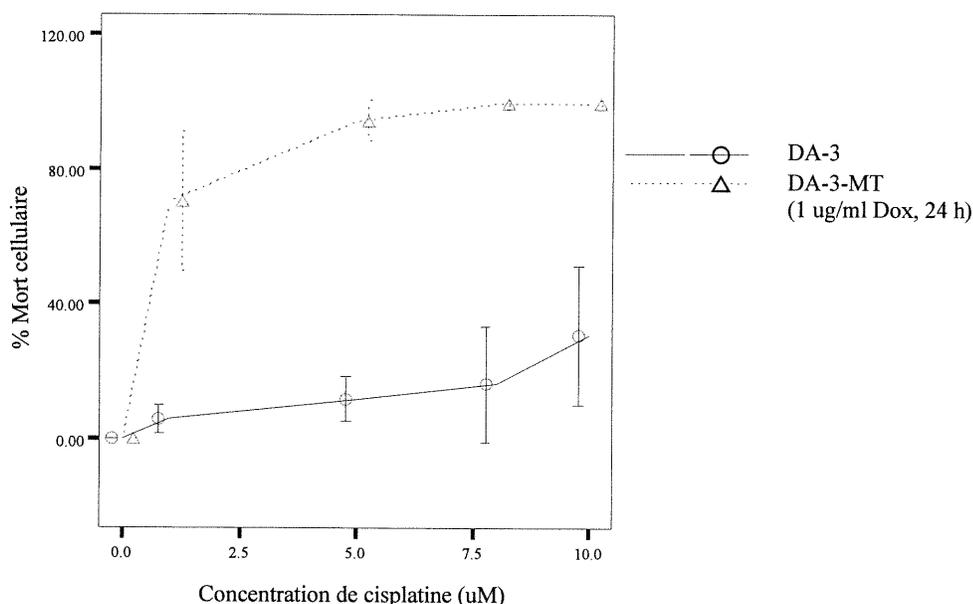


Figure 17. Effet du cisplatine sur la mortalité des cellules DA-3 et DA-3-MT. Ces cellules ont été exposées à différentes concentrations de cisplatine durant 96 heures. Le pourcentage de cellules encore vivantes a été calculé à partir d'une absorbance. Les cellules DA-3-MT ont été stimulées avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxycycline 24 heures avant l'exposition au cisplatine. Ces cellules ont une mortalité plus élevée comparativement aux cellules DA-3. Cette situation représente la plupart des essais MTT effectués. Dans d'autres cas cependant, la clonogénicité des cellules transfectées était similaire à celle des cellules non-transfectées.

Les cellules transfectées DA-3-MT et A549-MT ne semblent pas être plus résistantes que les cellules non-transfectées en ce qui concerne leur survie face au cisplatine et au carboplatine. Elles semblent plutôt, dans la majorité des cas, moins résistantes.

DISCUSSION

Nous avons cloné le gène MT dans un vecteur lentiviral pHR'CMV qui exprime de façon constitutive le transgène grâce à son promoteur CMV. Une transfection transitoire de ce plasmide recombinant a été effectuée, dans le but d'évaluer si ce dernier était fonctionnel et de déterminer le potentiel de protection du gène MT contre les médicaments du groupe platine. Le même gène a également été cloné dans un vecteur rétroviral, pRevTRE, se rapportant au système Tet-On. Une transfection stable, au lieu d'une transduction, de ces plasmides recombinants dans des cellules en culture a été exécutée ; cette méthode est plus simple, plus facile et plus rapide que la transduction. Nous avons ensuite observé si les cellules transfectées avec le gène MT démontraient plus de résistance face aux médicaments du groupe platine. Dans le contexte de l'obtention de résultats encourageants avec le système Tet-On, nous aurions poursuivi nos investigations avec des transductions.

Les plasmides lentiviraux pHR'CMV-LacZ et pHR'CMV-MT ont été transfectés séparément et transitoirement dans les cellules BOSC23. Nous avons choisi ces cellules hôtes pour la transfection des plasmides à cause de leur haute capacité de transfection (environ 50 pour cent). Les transfactions transitoires, comparativement aux transfactions stables et aux transductions, permettent d'étudier plus facilement les caractéristiques de la protéine exprimée par le transgène. Plusieurs copies s'introduisent dans la cellule et il y a une forte expression du transgène.

Nous avons effectué un essai clonogénique sur les cellules BOSC23 transfectées et non-transfectées pour comparer leur capacité de générer des clones après une exposition au carboplatine. Les cellules BOSC23-MT, comparativement aux cellules contrôles BOSC23 et BOSC23-LacZ, sont plus résistantes au carboplatine aux concentrations de 200 μ M et 600 μ M. En effet, les cellules BOSC23-MT ont produit plus de colonies à ces concentrations. Ces

colonies étaient plus grandes que celles formées par les cellules BOSC23 et BOSC23-LacZ. Cependant, aucune résistance n'a été observée à la concentration de 2000 μM .

Ces observations soutiennent qu'il peut exister une implication de la métallothionéine dans le mécanisme de résistance des cellules cancéreuses contre les médicaments à base de platine, ce qui était déjà établi [93, 144, 146, 155-162, 164]. Cependant, cette résistance est moindre que celle que nous attendions : il n'y avait pas de colonie développée par les cellules BOSC23-MT à 2000 μM .

Quelques hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Plusieurs processus de résistance développés par les cellules relativement aux médicaments à base de platine ont déjà été énumérés [7, 15, 41, 44-51]. Le phénomène de la résistance est multifactoriel [7]. Il est possible que la métallothionéine ne représente qu'un seul des facteurs impliqués dans la résistance et qu'elle n'ait pas à elle seule un impact assez puissant contre ces médicaments. Pour être plus résistante, une cellule cancéreuse doit peut-être posséder des mécanismes de résistance supplémentaires, telle une augmentation de la réparation de l'ADN.

Une autre hypothèse est basée sur le fait qu'il y ait plusieurs isoformes de la métallothionéine [142-144], qui diffèrent les unes des autres principalement par la location des cystéines [169]. Il est difficile de clarifier laquelle des isoformes présente une expression augmentée dans des cellules résistantes aux médicaments antinéoplasiques à base de platine [170]. Nous avons choisi d'utiliser l'isoforme MT-Ia pour une raison pratique et technique : l'ADNc du gène MT-Ia nous était facilement accessible. Il est possible qu'une autre isoforme soit responsable d'une plus forte résistance que celle causée par MT-Ia.

Il est probable que la synthèse de la métallothionéine entraîne un déséquilibre dans la cellule et déclenche un mécanisme de compensation. L'action de la métallothionéine est peut-être contrée partiellement par un mécanisme inconnu.

Une équipe [171] a récemment publié des résultats d'expériences *in vitro* différents de ceux *in vivo*. Des cellules transfectées avec le gène MT-I n'ont pas démontré de résistance *in vitro* contre le cisplatine. Cependant, des cellules cancéreuses contenant le transgène MT-I injectées dans des souris ont démontré de la résistance au cisplatine. Les chercheurs concluent que la résistance causée par la métallothionéine, déterminée *in vitro*, peut sous-représenter la situation *in vivo*. La résistance engendrée par le transgène MT serait possiblement plus élevée *in vivo* que celle que nous avons observée *in vitro*.

Les plasmides rétroviraux pRevTet-On et pRevTRE-MT, participants du système Tet-On, ont été transfectés l'un à la suite de l'autre de façon stable dans les cellules murines DA-3 et les cellules humaines A549. La transfection en série, au lieu d'une co-transfection, prévient l'intégration des deux plasmides au même endroit dans le génome. Ceci aurait occasionné un *crosstalk* entre les promoteurs des deux plasmides et, conséquemment, un bruit de fond.

Une transfection stable de ces plasmides, au lieu d'une transfection transitoire, imitait les conditions de la thérapie génique : les vecteurs se sont intégrés dans le génome et il n'existe qu'une copie du transgène par cellule. De plus, la doxycycline est plus simple à utiliser sur une lignée cellulaire transfectée de façon stable avec deux plasmides. Les clones obtenus après les transfusions ont tous été recueillis ensemble, au lieu d'identifier un clone particulier ayant un maximum d'induction et un minimum de bruit de fond. La raison est qu'éventuellement, en thérapie génique, toutes les cellules transduites

seront réintégrées dans le corps du patient. Nous avons vérifié, par RT-PCR semi-quantitatif, le bon fonctionnement du système Tet-On chez les cellules A549 et DA-3 ; 1 µg/ml de doxycycline induit une transcription du transgène MT dès 24 heures d'incubation, plus importante que lorsqu'il n'y a pas de doxycycline présente. Il est à noter que le RT-PCR a été effectué sur une population de cellules et non sur des cellules individuelles.

Les résultats des essais clonogéniques (tableaux II à V et figure 15) démontrent que les cellules DA-3 et A549 transfectées avec le gène MT tendent généralement moins à produire des clones que les cellules contrôles, après une exposition au cisplatine ou au carboplatine. Cette situation est vraie même pour les cellules DA-3-MT et A549-MT qui n'ont pas été exposées à de la doxycycline.

Les essais MTT (tableaux VI à IX et figure 16) visaient à comparer les pourcentages de cellules encore vivantes après une exposition aux médicaments. Les cellules DA-3-MT et A549-MT, induites ou non par de la doxycycline, tendent à de rares exceptions près à mourir en plus grand nombre que les cellules de référence. Lorsque ceci n'est pas le cas, les cellules transfectées ont une mortalité similaire à celle des cellules contrôles.

Ces résultats sont contraires à nos attentes : nous nous attendions à ce que le gène MT protège les cellules A549 et DA-3. Selon ces observations, le transgène MT utilisé avec le système Tet-On dans le contexte d'une transfection stable ne convient pas pour une thérapie génique.

L'absence de protection des cellules par le gène MT peut être expliquée par les mêmes hypothèses énumérées ci-dessus. Cependant, d'autres suppositions peuvent être émises pour expliquer le fait que la plupart des

cellules transfectées perdent leur capacité de produire des colonies et meurent en plus grand nombre.

Plausiblement, les cellules DA-3 et A549 sont devenues plus vulnérables à n'importe quel stress supplémentaire, telle l'exposition à des médicaments antinéoplasiques. Le fait que deux plasmides aient été transfectés dans ces cellules peut avoir dérangé l'équilibre biochimique, génomique ou chromatidique. Par exemple, la capacité de réparer l'ADN ou les mécanismes de transport des médicaments à base de platine sont peut-être affectés. En outre, l'expression de la protéine exogène rtTA, par le plasmide pRevTet-On, peut être toxique. Elle peut même inhiber la croissance [83]. Il est possible que ces situations s'appliquent aux cellules A549-MT et DA-3-MT ; leur seuil de toxicité tolérable serait atteint plus rapidement après une exposition aux médicaments du groupe platine.

D'autre part, l'expression de la métallothionéine n'est possiblement pas assez forte lorsqu'elle est sous le contrôle du promoteur dépendant de la doxycycline. Une expression constitutive de cette protéine est peut-être nécessaire pour qu'il y ait de la résistance.

L'induction de la transcription du transgène MT par la doxycycline n'apporte aucun changement aux cellules transfectées en terme de clonogénicité et de mortalité face aux médicaments du groupe platine, si on les compare aux cellules transfectées non-induites : elles sont similairement sensibles aux effets du carboplatine et du cisplatine. L'expression basale du transgène semble moins importante que lorsqu'il y a une stimulation par la doxycycline, mais il n'est pas impossible qu'elle soit quand même assez élevée. En effet, un des désavantages du système Tet-On est la possibilité d'une induction basale importante [83]. Si c'était le cas, cela empêcherait l'observation d'un nouveau phénotype lors d'une induction à la doxycycline. Cependant, nous croyons que la mortalité plus

élevée des cellules transfectées avec le transgène MT (induites ou non) n'est pas due à ce dernier, mais aux autres facteurs énumérés ci-dessus.

Nous concluons que le gène MT dans le contexte d'un vecteur lentiviral et sous le contrôle d'un promoteur fort CMV protège jusqu'à une certaine limite les cellules BOSC23 contre les effets toxiques du carboplatine et du cisplatine. Cette protection est cependant absente dans le contexte d'un vecteur rétroviral classique dont l'expression du gène MT dans les cellules A549-MT et DA-3-MT est sous le contrôle du système Tet-On.

Les résultats des transfections stables des cellules A549-MT et DA-3-MT ne justifient pas présentement l'élaboration d'un protocole de thérapie génique à l'aide des rétrovirus classiques. Cependant, les adénovirus peuvent contribuer à contourner les difficultés des transfections stables (et de l'expression rétrovirale), parce que les niveaux et la cinétique de l'expression du transgène dans les cellules transduites à l'aide des adénovirus se rapprochent des transfections transitoires pour lesquelles nous avons obtenu une protection contre les effets toxiques des médicaments du groupe platine. Les adénovirus ont l'avantage de transduire efficacement et des cellules quiescentes et des cellules en division [171, 172]. Ils ne s'intègrent pas dans le génome : ils forment des épisomes, ce qui ne déstabilise probablement pas l'équilibre génomique. L'expression du transgène est forte [173, 174]. Il serait possible dans ce cas d'obtenir de meilleurs résultats de protection.

Nos travaux ont contribué à clarifier les mécanismes moléculaires de protection contre les effets toxiques des médicaments du groupe platine, qui semblent plus complexes que l'effet protecteur d'un seul gène.

RÉFÉRENCES

1. DeVita VT (1989). Principles of chemotherapy. Dans: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (Éds), Cancer: principles and practices of oncology, 278. Philadelphia : JB Lippincott.
2. Bertino JR. Turning the tables – making normal marrow resistant to chemotherapy. J Natl Cancer Inst., 82 : 1234-1235, 1990.
3. Hryniuk WM. More is better. J Clin Oncol., 9 : 1365-1367, 1988.
4. Masson E, Zamboni WC. Pharmacokinetic optimisation of cancer chemotherapy. Effects on outcomes. Clin Pharmacokinet., 32 : 324-343, 1997.
5. Wittkowski AK. Generic warfarin: implications for patient care. Pharmacotherapy, 17 : 640-643, 1997.
6. Benet LZ, Goyan JE. Bioequivalence and narrow therapeutic drugs. Pharmacotherapy, 15 : 433-440, 1995.
7. Perez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. Eur J Cancer, 34 : 1535-1542, 1998.
8. Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Calabresi P (1996). Antineoplastic agents. Dans Hardman JG, Limbird LL, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (Éds), Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics (1233-1287). New York : McGraw-Hill.
9. Ozols RF, Williams SD. Testicular cancer. Curr Probl Cancer, 13 : 285-335, 1989.

10. Loehrer PJ, Einhorn LH. Drugs five years later. Cisplatin. *Ann Intern Med.*, 100 : 704-713, 1984.
11. Ozols RF. Ovarian cancer, part II : treatment. *Curr Probl Cancer*, 16 : 63-126, 1992.
12. Dimery IW, Hong WK. Overview of combined modality therapies for head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 85 : 95-111, 1993.
13. Harrap KR. Initiatives with platinum- and quinazolines-based antitumor molecules -- Fourteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res.*, 55 : 2761-2768, 1995.
14. Wagstaff AJ, Ward A, Benfield P, Heel RC. Carboplatin. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of cancer. *Drugs*, 37 : 162-190, 1989.
15. O'Dwyer PJ, Jonhson SW, Hamilton TC (1997). Pharmacology of cancer Chemotherapy. Dans DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (Éds), *Cancer. Principles ε Practice of Oncology* (375–512). Philadelphia : Lippincott-Raven.
16. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin : a review. *Br J Cancer*, 67 : 1171-1176, 1993.
17. Honess DJ, Bleehen NM. Thermochemotherapy with cisplatin, CCNU, BCNU, chlorambucil and melphalan on murine marrow and two tumors : therapeutic gain for melphalan only. *Br J Radiol.*, 58 : 63-72, 1985.
18. Andrews PA, Velury S, Mann SC, Howell SB. cis-Diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.*, 48 : 68-73, 1988.

19. Zwelling LA, Kohn KW (1980). Effects of cisplatin on DNA and the possible relationships to cytotoxicity and mutagenicity in mammalian cells. Dans : Prestayko AW, Crooke ST, Carter SK (Éds), Cisplatin, current status and new developments (21-36). New York : Academic Press.
20. Douple EB. cis-Diamminedichloroplatinum(II) : effects of a representative metal coordination complex on mammalian cells. *Pharmacol Ther.*, 25 : 297-326, 1984.
21. Eastman A. Characterisation of the adducts produced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II). *Biochemistry*, 22 : 3927-3933, 1983.
22. Eastman A. Re-evaluation of the interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. *Biochemistry*, 25 : 3912-3915, 1986.
23. Micetich KC, Barnes D, Erickson LC. A comparative study of the cytotoxicity and DNA-damaging effects of *cis*-(diammino)(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum(II) and *cis*-diamminedichloroplatinum(II) on L1210 cells. *Cancer Res.*, 45 : 4043-4047, 1985.
24. Fraval H, Rawlings C, Roberts J. Increased sensivity of UV-repair-deficient human cells to DNA bound platinum products which unlike thymidine dimers are not recognized by an endonuclease extracted from *micrococcus luteus*. *Mutat Res.*, 51 : 121-132, 1978.
25. Hoy C, Thompson L, Mooney C, Salazar E. Defective DNA crosslink removal in Chinese hamster cell mutant hypersensitive to bifunctional alkylating agents. *Cancer Res.*, 45 : 1737-1743, 1985.

26. Dijt F, Fitchinger-Schepman A, Berends F, Reedjik J. Formation and repair of cisplatin-induced adducts to DNA in cultured normal and repair-deficient human fibroblasts. *Cancer Res.*, 48 : 6058-6062, 1988.
27. Masuda H, Ozols RF, Lai G-M, Fojo A, Rothenberg M, Hamilton TC. Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.*, 48 : 5713-5716, 1988.
28. Lai GM, Ozols RF, Smyth JF, Young RC, Hamilton TC. Enhanced DNA repair and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. *Biochem Pharmacol.*, 37 : 4597-4600, 1988.
29. Masuda M, Tanaka T, Matsuda H, Kusaba I. Increased removal of DNA-bound platinum in a human ovarian cancer cell line resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.*, 50 : 1863-1866, 1990.
30. Parker RJ, Eastman A, Bostik-Burton F, Reed E. Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. *J Clin Invest.*, 87 : 772-777, 1991.
31. Jonhson SW, Perez RP, Godwin AK, Yeung AT, Handel LM, Ozols RF, Hamilton TC. Role of platinum-DNA adducts formation and removal in cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Biochem Pharmacol.*, 47 : 689-697, 1994.
32. Katz E, Andrews P, Howell S. The effect of DNA polymerase inhibitors on the cytotoxicity of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Commun.*, 2 : 159-164, 1990.

33. Knox RJ, Friedlos F, Lydall DA, Roberts JJ. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res.*, 46 : 1972-1979, 1986.
34. Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst.*, 82 : 749-755, 1990.
35. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins, and hyperthermia. *Biochem Pharmacol.*, 40 : 2353-2362, 1990.
36. Evans DL, Dive C. Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferative hepatoma cells and nonproliferating immature thymocytes. *Cancer Res.*, 53 : 2133-2139, 1993.
37. Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells*, 2 : 275-280, 1990.
38. Yee CS, Kamradt JM, Nielsen C, Panchivian R, Pienta KJ. Carboplatin-induced cell death in model prostate cancer systems. *Anticancer Res.*, 18 : 4475-4482, 1998.
39. Evans DL, Tilby M, Dive C. Differential sensitivity to the induction of apoptosis by cisplatin in proliferating and quiescent immature rat thymocytes is independent of the levels of drug accumulation and of DNA adduct formation. *Cancer Res.*, 54 : 1596-1603, 1994.
40. Jeha S, Jaffe N, Robertson R. Secondary acute nonlymphoblastic leukemia in two children following treatment with a *cis*-diammine-dichloroplatinum-II-based regimen for osteosarcoma. *Med Pediatr Oncol.*, 20 : 71-74, 1992.

41. Andrews P, Howell S. Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells*, 2 : 35-43, 1990.
42. Bedford P, Fichtinger-Schepman AMJ, Shellard SA, Walker C, Masters JRW, Hill BT. Differential repair of platinum-DNA adducts in human bladder and testicular tumour continuous cell lines. *Cancer Research*, 48 : 3019-3024, 1988.
43. Masters JR, Thomas R, Hall AG, Hogarth L, Matheson EC, Cattan AR, Lohrer H. Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. *Eur J Cancer*, 32A : 1248-1253, 1996.
44. Hromas RA, North JA, Burns CP. Decreased platinum uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett.*, 36 : 197-201, 1987.
45. Waud WR. Differential uptake of cis-diamminedichloroplatinum (II) by sensitive and resistant murine L1210 leukemia cells. *Cancer Res.*, 47 : 6549-6555, 1987.
46. Perez R, Hamilton T, Ozols R. Resistance to alkylating agents and cisplatin : insights from ovarian carcinoma model systems. *Pharmacol Ther.*, 48 : 19-27, 1990.
47. Perez RP, Jonhson SW, Hamilton TC (1997). New strategies of systemic therapy : mechanisms and modulation of resistance to platinum-containing anticancer drugs. Dans : Rhagavan D, Sher H, Liebel S, Lange P (Éds), *Principles and Practice of Genitourinary Oncology*, 111-119. Philadelphia : Lippincott-Raven.
48. Yang LY, Trujillo JM, Siciliano MJ, Kido Y, Siddik ZH, Su YZ. Distinct P-glycoprotein expression in two subclones simultaneously selected from a human colon carcinoma cell line by cis-diamminedichloroplatinum (II). *Int J Cancer*, 53 : 478-485, 1993.

49. Köberle BB, Payne J, Grimaldi KA, Hartley JA, Masters JRW. DNA repair in cisplatin-sensitive and resistant human cell lines measured in specific genes by quantitative polymerase chain reaction. *Biochem Pharmacol.*, 52 : 1729-1734, 1996.
50. Karran P, Bignami M. DNA damage tolerance, mismatch repair, and genome instability. *Bioessays*, 16 : 833-839, 1994.
51. Fishel R, Kolodner RD. Identification of mismatch repair genes and their roles in the development of cancer. *Curr Opin Genet Dev.*, 5 : 382-395, 1995.
52. Olas B, Wachowicz B, Buczynski A. Adhesion of blood platelets to collagen and fibrinogen after treatment with cisplatin and its complex with glutathione. *Cytobios.*, 102 : 75-84, 2000.
53. Harrap KR. Preclinical Studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. *Cancer Treat Rev.*, 12 : Supp A, 21-33, 1985.
54. Alberts DS, Green S, Hannigan EV, O'Toole R, Stock-Novack D, Anderson P, Surwit EA, Malvly VA, Nahhas WA, Jolles CJ. Improved therapeutic index of carboplatin plus cyclophosphamide versus cisplatin plus cyclophosphamide: final report by the Southwest Oncology group of a phase III randomized trial in stages 3 and 4 ovarian cancer. *J Clin Oncol.*, 10 : 706-717, 1992.
55. Calvert AH, Newell DR, Gumbrell LA, O'Reilly S, Burnell M, Boxall FE, Siddik ZH, Judson IR, Gore ME, Wiltshaw E. Carboplatin dosage : prospective evaluation of a simple formula based on renal function. *J Clin Oncol.*, 7 : 1748-56, 1989.
56. Miller N, Vile R. Targeted vectors for gene therapy. *FASEB J.*, 9, 190-199, 1995.

57. Walther W, Stein U. Targeted vectors for gene therapy of cancer and retroviral infections. *Mol Biotechnol.*, 6 : 267-286, 1996.
58. Marshall E. Gene Therapy on trial. *Science*, 288 : 951-957, 2000.
59. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bouso P, Deist FL, Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288 : 669-672, 2000.
60. Smaglik P. Tighter watch urged on adenoviral vectors...with proposal to report all 'adverse events'. *Nature*, 402 : 707, 1999.
61. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*, 260 : 926-932, 1993.
62. Introduction of DNA into mammalian cells. Dans : Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DE, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Éds), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons : New York.
63. Hanania EG, Kavanagh J, Hortobagyi G, Giles RE, Champlin R, Deisseroth AB. Recent advances in the application of gene therapy to human disease. *Am J Med.*, 99 : 537-552, 1995.
64. Lowy DR (1986). Transformation and oncogenesis : retroviruses. Dans Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Melnick JL, Reizman B, Shope RE (Éds), *Fundamental Virology*. New York : Raven Press.
65. Naldini L, Blömer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272 : 263-267, 1996.

66. Gally P, Swingler S, Song J, Bushman F, Trono D. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell*, 83 : 569-576, 1995.
67. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.*, 72 :8463-8471, 1998.
68. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 93 : 11382-11388, 1996.
69. Blömer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol.*, 71 : 6641-6649, 1997.
70. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol.*, 15 : 871-875, 1997.
71. Kafri T, Blömer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet.*, 17 : 314-317, 1997.
72. Case SS, Price MA, Jordan CT, Yu XJ, Wang L, Bauer G, Haas DL, Xu D, Stripecke R, Naldini L, Kohn DB, Crooks GM. Stable transduction of quiescent CD34⁺CD38⁻ human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci.*, 96 : 2988-2993, 1999.

73. Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS. High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol.*, 70 : 2581-2585, 1996.
74. Sutton RE, Wu HT, Rigg R, Bonhlein E, Brown PO. Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells. *J Virol.*, 72 : 5781-5788, 1998.
75. Uchida N, Sutton RE, Frieria AM, He D, reitsma MJ, Chang WC, Veres G, Scollay R, Weissman IL. HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 95 : 11939-11944, 1998.
76. Mastromarino P, Conti C, Goldoni P, Hauttecoeur B, Orsi N. Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. *J Gen Virol.*, 68 : 2359-2369, 1987.
77. Cohen J. New Role for HIV : a vehicle for moving genes into cells. *Science*, 272 : 195, 1996.
78. Paillard F. "Tet-On": A gene switch for the exogenous regulation of transgene expression. *Hum Gene Ther*, 9 : 983-985, 1998.
79. Rossi FM, Blau HM. Recent Advances in inducible gene expression systems. *Curr Opin Biotechnol.*, 9 : 451-456, 1998.
80. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 89 : 5547-5551, 1992.

81. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268 : 1766-1769, 1995.
82. Bohl D, Naffakh N, Heard JM. Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat Med.*, 3 : 299-305, 1997.
83. Saez E, No D, West A, Evans RM. Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol.*, 8 : 608-616, 1997.
84. Garrick D, Fiering S, Martin DI, Whitelaw E. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet.*, 18 : 56-59, 1998.
85. Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N, Schatz DG. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 92 : 6522-6526, 1995.
86. Shockett PE, Schatz DG. Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 93 : 5173-5176, 1996.
87. Blau HM, Rossi FM. Tet B or not Tet B : advances in tetracycline-inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 96 : 797-799, 1999.
88. Saitoh Y, Eguchi Y, Hagihara Y, Arita N, Watahiki M, Tsushimoto Y, Hayakawa T. Dose-dependent doxycycline-mediated adrenocorticotrophic hormone secretion from encapsulated Tet-On proopiomelanocortin Neuro2A cells in the subarachnoid space. *Hum Gene Ther.*, 9 : 997-1002, 1998.
89. Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science*, 274 : 1678-1683, 1996.

90. Mansuy IM, Mayford M, Jacob B, Kandel ER, Bach ME. Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell*, 92 : 39-49, 1998.
91. Mansuy IM, Winder DG, Moallem TM, Osman M, Mayford M, Hawkins RD, Kandel ER. Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron*, 21 : 257-265, 1998.
92. Xie W, Chow LT, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE. Conditional expression of the ErbB2 oncogene elicits reversible hyperplasia in stratified epithelia and up-regulation of TGF α expression in transgenic mice. *Oncogene*, 18 : 3593-3607, 1999.
93. 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*, 85 : 3342-3351, 1995.
94. Schwarzenberger P, Spence S, Lohrey N, Kmiecik T, Longo DL, Murphy WJ, Ruscetti FW, Keller JR. Gene transfer of multidrug resistance into a factor-dependent human hematopoietic progenitor cell line : in vivo model for genetically transferred chemoprotection. *Blood*, 87 : 2723-2731, 1996.
95. Chin KV, Pastan I, Gottesman MM. Function and regulation of the human multidrug resistance gene. *Adv Cancer Res.*, 60:157-180, 1993.
96. Boesen JJ, Nooter K, Valerio D. Circumvention of chemotherapy-induced myelosuppression by transfer of the mdr1 gene. *Biotherapy*, 6 : 291-302, 1993.
97. Galski H, Sullivan M, Willingham MC, Chin K-V, Gottesman MM, Pastan I, Merlino GT. Expression of a human multidrug resistance cDNA (MDR1) in the bone marrow of transgenic mice: resistance to daunomycin-induced leukopenia. *Mol Cell Biol.*, 9 : 4357-4363, 1989.

98. Mickisch GH, Merlino GT, Galski H, Gottesman MM, Pastan I. Transgenic mice that express the human multidrug-resistance gene in the bone marrow enable a rapid identification of agents that reverse drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 88 : 547, 1991.
99. Mickisch GH, Licht T, Merlino GT, Gottesman MM, Pastan I. Chemotherapy and chemosensitization of transgenic mice which express the human multidrug resistance gene in bone marrow: efficacy, potency, and toxicity. *Cancer Res.*, 51: 5417-24, 1991.
100. Mickisch G, Arsentijevich I, Schœnlein P, Goldstein LJ, Galski H, Stahle C, Sachs DH, Pastan I, Gottesman MM. Transplantation of bone marrow cells from transgenic mice expressing the human MDR1 gene results in long term protection against the myelosuppressive effect of chemotherapy in mice. *Blood*, 79 : 1087-1093, 1992.
101. McLachlin JR, Eglitis MA, Ueda K, Kantoff PW, Pastan IH, Anderson WF, Gottesman MM. Expression of a human complementary DNA for the multidrug resistance gene in murine hematopoietic precursor cells with the use of a retroviral gene transfer. *J Natl Cancer Inst.*, 82 : 1260, 1990.
102. Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine DM, Gottesman MM, Pastan I, Cline A, Nienhuis AW. Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science*, 257 : 99-103, 1992.
103. Podda S, Ward M, Himmelstein A, Richardson C, de la Flor-Weiss E, Smith L, Gottesman MM, Pastan I, Bank A. Transfer and expression of the human multiple drug resistance gene into live mice. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 89 : 9676-9680, 1992.

104. Bodine DM, Seidel NE, Gale MS, Nienhuis AW, Orlic D. Efficient retrovirus transduction of mouse pluripotent hematopoietic stem cells mobilized into the peripheral blood by treatment with granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor. *Blood*, 84 : 1482-1491, 1994.
105. Hanania EG, Deisseroth AB. Serial transplantation shows that early hematopoietic precursor cells are transduced by MDR-1 retroviral vector in a mouse gene therapy model. *Cancer Gene Ther.*, 1 : 21-25, 1994.
106. Licht T, Aksentijevich I, Gottesman MM, Pastan I. Efficient expression of functional human MDR1 gene in murine bone marrow after retroviral transduction of purified hematopoietic stem cells. *Blood*, 86 : 111-121, 1995.
107. O'Shaughnessy JA, Cowan KH, Nienhuis AW. 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.*, 5 : 891-911, 1994.
108. Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E, Sorrentino BP. Effects of retroviral-mediated MDR1 expression on hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation in culture. *Ann N Y Acad Sci.*, 872 : 125-140, 1999.
109. Blakley RL (1984). Dans : Blakley RL, Benkovic SJ (Éds), *Folates and Pterins : Chemistry and Biochemistry of Folates*, vol 1 (191-253). New York : John Wiley & Sons.
110. Schweitzer BI, Dicker AP, Bertino JR. Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J.*, 4 : 2441-2452, 1990.
111. Sirotiak FM, Moccio DM. Pharmacokinetic basis for differences in methotrexate sensitivity of normal proliferative tissues in the mouse. *Cancer Res.*, 40 : 1230-1234, 1980.

112. Rivera GK, Evans WE, Kalwinsky DK, Mirro J, Ochs J, Dow LW, Abromowitch M, Pui C, Dahl GV, Look AT, Crone M, Murphy SB. Unexpectedly severe toxicity from intensive early treatment of childhood lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.*, 3 : 201-206, 1985.
113. Fanin R, Banerjee D, Volkenandt M, Waltham M, Li WW, Dicker AP, Schweitzer BI, Bertino JR. Mutations leading to antifolate resistance in Chinese hamster ovary cells after exposure to the alkylating agent ethylmethanesulfonate. *Mol Pharmacol.*, 44 : 13-21, 1993.
114. May C, Gunther R, McIvor RS. Protection of mice from lethal doses of methotrexate by transplantation with transgenic marrow expressing drug-resistant dihydrofolate reductase activity. *Blood*, 86 : 2439-2448, 1995.
115. Corey CA, DeSilva AD, Holland CA, Williams DA. Serial transplantation of methotrexate-resistant bone marrow : protection of murine recipients from drug toxicity by progeny of transduced stem cells. *Blood*, 75 : 337-43, 1990.
116. Pegg AE. Mammalian O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase: Regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res.*, 50 : 6119-6129, 1990.
117. Richardson KK, Richardson FC, Crystal RM, Swenberg JA, Skopek TR. DNA base changes and alkylation following in vivo exposure of Escherichia Coli to N-methyl-N-nitrosourea. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 84 : 344-348, 1989.
118. Tong WP, Kirk MC, Ludlum DB. Formation of the cross link 1-(N³-deoxycytidyl), 2-(N¹-deoxyguanosinyl)-ethane in DNA treated with N,N¹-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Res.*, 42 : 3102-3105, 1982.
119. Pegg AE, Wiest L, Foote RS, Mitra S, Perry W. Purification and properties of O⁶-methylguanine-DNA transmethylase from rat liver. *J Biol Chem.*, 258 : 2327-2333, 1983.

120. Pegg AE, Scicchitano D, Dolan ME. Comparison of the rates of repair of O⁶-alkylguanines in DNA by rat liver and bacterial O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Cancer Res.*, 9 : 3006-3011, 1984.
121. Lindahl T. DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem.*, 51 : 61-87, 1982.
122. Bogden JM, Eastman A, Bresnick E. A system in mouse liver for the repair of O⁶-methylguanine lesions in methylated DNA. *Nucleic Acids Res.*, 9 : 3089-3103, 1981.
123. Gerson SL, Miller K, Berger NA. O⁶Alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human myeloid cells. *J Clin Invest.*, 76 : 2106-2114, 1985.
124. Gerson SL, Trey JE, Miller K, Berger NA. Comparison of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat, and mouse tissues. *Carcinogenesis*, 7 : 745-749, 1986.
125. Gerson SL, Trey JE, Miller K, Benjamin E. Repair of O⁶-alkylguanine during DNA synthesis in murine bone marrow hematopoietic precursors. *Cancer Res.*, 47 : 89-95, 1987.
126. Dumenco LL, Warman B, Hatzoglou M, Lim IK, Abboud SL, Gerson SL. Increase in nitrosourea resistance in mammalian cells by retrovirally mediated gene transfer of bacterial O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Cancer Res.*, 49 : 6044-6051, 1989.
127. Lim IK, Dumenco LL, Hatzoglou M, Hanson RW, Gerson SL. Increased drug resistance following retroviral gene transfer of a chimeric P-enolpyruvate carboxykinase (GTP)-bacterial O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase gene into NRK cells. *Carcinogenesis* 11 : 737-743, 1990.

128. Minnick DT, Gerson SL, Dumenco LL, Veigl ML, Sedwick WD. Specificity of bischloroethylnitrosourea-induced mutation in a Chinese hamster ovary cell line transformed to express human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Cancer Res.*, 53 : 997-1003, 1993.
129. Dumenco LL, Arce C, Norton K, Yun J, Wagner T, Gerson SL. Enhanced repair of O⁶-methylguanine DNA adducts in the liver of transgenic mice expressing the ada gene. *Cancer Res.*, 51: 3391-3398, 1991.
130. Dumenco LL, Allay E, Norton K, Gerson SL. The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Science*, 259:219-222, 1993.
131. Eliopoulos N, Cournoyer D, Momparler RL. Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2',2'-difluorodeoxycytidine and cytosine arabinoside conferred by retroviral-mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 42 : 373-378, 1998.
132. Momparler RL, Eliopoulos N, Bovenzi V, Létourneau S, Greenbaum M, Cournoyer D. Resistance to cytosine arabinoside by retrovirally mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther.*, 3 : 331-338, 1996.
133. Bouffard DY, Laliberté J, Momparler RL. Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem Pharmacol.*, 45:1857 - 1861, 1993.
134. Chabot GG, Bouchard J, Momparler RL. Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymine or uracil arabinoside. *Biochem Pharmacol.*, 32 : 1327-1328, 1983.

135. Müller WEG, Zahn RK. Metabolism of 1- β -D-arabinofuranosyluracil in mouse L5178Y cells. *Cancer Res.*, 39 : 1102, 1979.
136. Rivard GE, Momparler RL, Demers J, Benoit P, Raymond R, Lin K, Momparler LF. Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia. *Leuk Res.*, 5 : 453-462, 1981.
137. Czaykowski PM, Samuels T, Oza A. A durable response to cytarabine in advanced breast cancer. *Clin Oncol. (R Coll Radiol)*, 9 : 181-183, 1997.
138. Fossella FV, Lippman SM, Shin DM, Tarassof P, Calayag-Jung M, Perez-Soler R, Lee JS, Murphy WK, Glisson B, Rivera E, Hong WK. Maximum-tolerated dose defined for single-agent gemcitabine : a phase I dose-escalation study in chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.*, 15 : 310-316, 1997.
139. Momparler RL, Bouffard DY, Momparler LF, Dionne J, Belanger K, Ayoub J. Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anticancer Drugs*, 8 : 358-368, 1997.
140. Momparler RL, Laliberté J, Eliopoulos N, Beausejour C, Cournoyer D. Transfection of murine fibroblast cells with human cytidine deaminase cDNA confers resistance to cytosine arabinoside. *Anticancer Drugs*, 7 : 266-274, 1996.
141. Stennard FA, Holloway AF, Hamilton J, West AK. Characterisation of six additional human metallothionein genes. *Biochim Biophys Acta*, 1218 : 357-365, 1994.
142. Kägi JHR, Schaffer A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27 : 8509-8515, 1988.

143. Bahnson RR, Basu A, Lazo JS (1991). The role of metallothioneins in anti-cancer-drug resistance. Dans Ozols RF (Éd), *Molecular and clinical advances in anticancer-drug resistance* (251-260). Boston : Kluwer.
144. Jasani B, Schmidt KW. Significance of metallothionein over-expression in human tumors. *Histopathology*, 31 : 211-214, 1997.
145. Richards RI, Heguy A, Karin M. Structural and functional analysis of the human metallothionein-IA gene : differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell*, 37 : 263-272, 1984.
146. Kraker A, Schmidt J, Krezoski S, Pethering DH. Binding of cis-dichlorodiammine platinum(II) to metallothionein in Ehrlich cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 130 : 786-792, 1985.
147. Pattanaik A, Bachowski G, Laib J, Lemkuil D, Shaw CF 3d, Petering DH, Hitchcock A, Saryan L. Properties of the reaction of cis-dichlorodiammineplatinum(II) with metallothionein. *J Biol Chem.*, 267 : 16121-16128, 1992.
148. Hamer DH. Metallothionein. *Annu Rev Biochem*. 55 : 913-951, 1986.
149. Kojima Y (1991). Definitions and nomenclature of metallothioneins. Dans : Riordan JF, Vallee BL (Éds), *Metallothionein and Related Molecules, Methods in Enzymology*. San Diego (8-10): Academic Press.
150. Foulkes EC (1978). Role of metallothionein in epithelial transport and sequestration of cadmium. Dans : Klaassen CD, Suzuki KT (Éds), *Metallothionein in Biology and Medicine* (171-182). Boca Raton : CRC Press.
151. Templeton DM, Cherian MG (1991). Toxicological significance of metallothionein. Dans : Riordan JF, Vallee BL (Éds), *Metallothionein and*

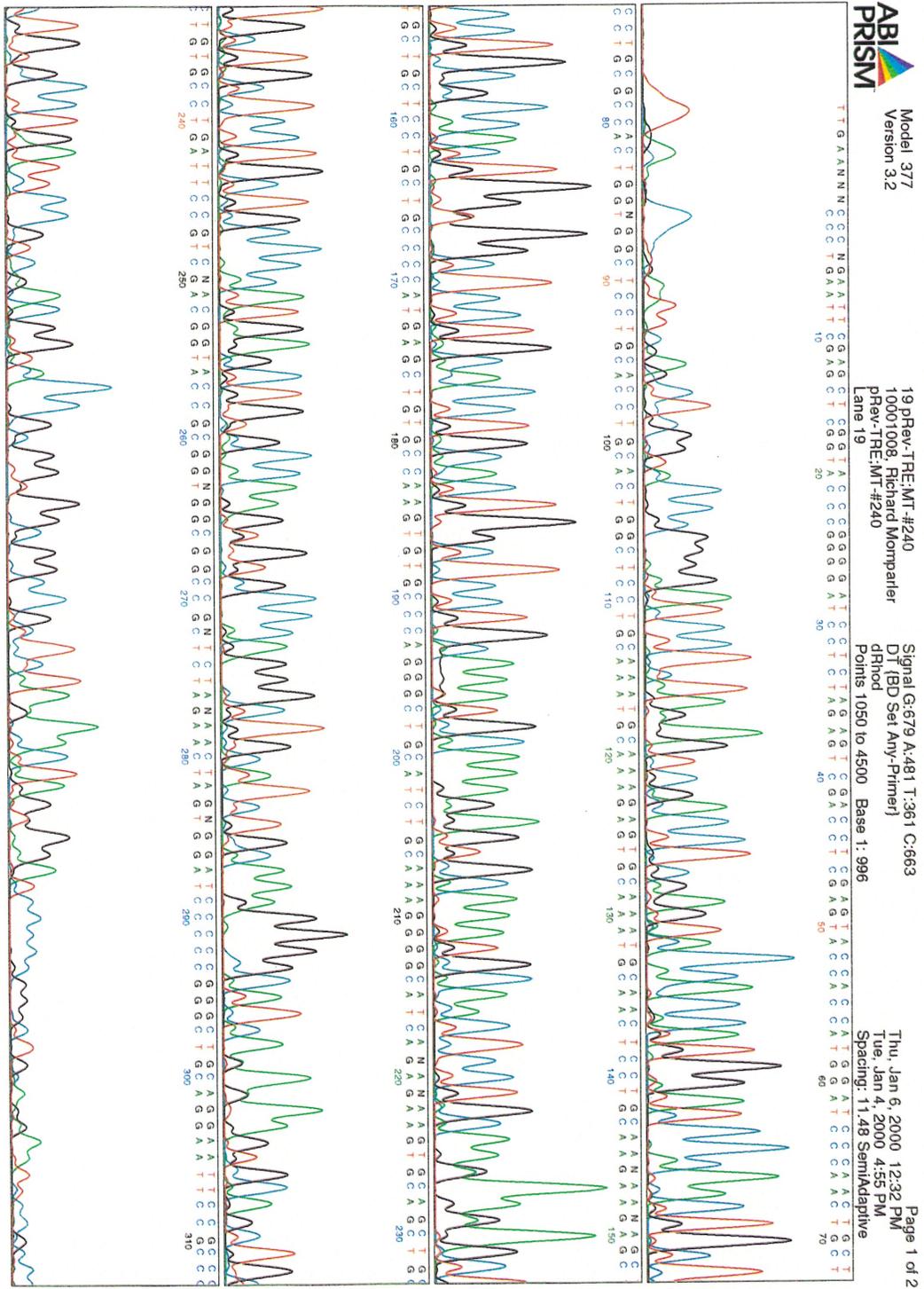
- Related Molecules, *Methods in Enzymology* (11-24). San Diego : Academic Press.
152. Bremner I (1991). Nutritional and physiologic significance of metallothionein. Dans : Riordan JF, Vallee BL (Éds.), *Metallothionein and Related Molecules. Methods in Enzymology* (25-35). San Diego : Academic Press.
 153. Zhang B, Tang W, Gao S, Zhou Y. Platinum binding to metallothionein. Analysis of circular dichroism spectra of complexes formed between metallothionein and platinum from cis- and trans- diamminedichloroplatinum. *J Inorg Biochem.*, 58 : 9-19, 1995.
 154. Kay J, Cryer A, Darke BM, Kille P, Lees WE, Norey CG, Stark JM. Naturally occurring and recombinant metallothioneins: structure, immunoreactivity and metal-binding functions. *Int J Biochem.*, 23 : 1-5, 1991.
 155. Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JC, Allen WP, Whitmore M, Bergonia HA, Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Lancaster JR Jr, Pitt BR. Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 92 : 4452-4456, 1995.
 156. Ferguson PJ. Mechanisms of resistance of human tumors to anticancer drugs of the platinum family : a review. *J Otolaryngol.*, 24 : 242-251, 1995.
 157. Koropatnick J, Pearson J. Altered cisplatin and cadmium resistance and cell survival on Chinese hamster ovary cells expressing mouse metallothionein. *Mol Pharmacol.*, 44 : 44-50, 1993.
 158. Meijer C, Mulder NH, Hospers GAP, Uges DRA, DeVries EG. The role of glutathione in resistance to cisplatin in a human small cell lung cancer cell line. *Br J Cancer*, 62 : 72-77, 1990.

159. Kelley SL, Basu A, Teicher BA, Hacker MP, Hamer DH, Lazo JS. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science*, 241 : 1813-1815, 1988.
160. Andrews PA, Murphy MP, Howell SB. Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 19 : 149-154, 1987.
161. Schilder RJ, Hall L, Monks A. Metallothionein gene expression and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. *Int J Cancer*, 45 : 416-422, 1990.
162. Doz F, Berens ME, Deschepper CF, Dougherty DV, Bigornia V, Barker M, Rosenblum ML. Experimental basis for increasing the therapeutic index of cis-diamminedicarboxylatocyclobutaneplatinum(II) in brain tumor therapy by a high-zinc diet. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 29 : 219-226, 1992.
163. Satoh M, Kondo Y, Mita M, Nakagawa I, Naganuma A, Imura N. Prevention of carcinogenicity of anticancer drugs by metallothionein induction. *Cancer Res.*, 53 : 4767-4768, 1993.
164. Chin JL, Banerjee D, Kadhim SA, Kontozoglou TE, Chauvin PJ, Cherian MG. Metallothionein in testicular germ cell tumors and drug resistance. Clinical correlation. *Cancer*, 72 : 3029-3035, 1993.
165. Farnworth PG, Hillcoat BL, Roos IA. Metallothionein induction in mouse tissues by cis-dichlorodiammineplatinum(II) and its hydrolysis products. *Chem Biol Interact.*, 69 : 319-332, 1989.
166. Wei D, Fabris D, Fenselau C. Covalent sequestration of phosphoramidate mustard by metallothionein -- an in vitro study. *Drug Metab Dispos.*, 27 : 786-791, 1999.

167. Kondo Y, Himeno S, Endo W, Mita M, Suzuki Y, Nemoto K, Akimoto M, Lazo JS, Imura N. Metallothionein modulates the carcinogenicity of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in mice. *Carcinogenesis*. 20 :1625-1627, 1999.
168. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, 48 : 4827-4833, 1988.
169. Kägi JHR, Kojima Y. Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Supplementum*, 52 : 25-61, 1987.
170. Ebadi M, Iversen PL. Metallothionein in carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Gen Pharmac.*, 25 : 1297-1310, 1994.
171. Toyoda H, Mizushima T, Satoh M, Iisuka NN, Nomoto A, Chiba H, Mita M, Naganuma A, Himeno S, Imura N. HeLa cell transformants overproducing mouse metallothionein show in vivo resistance to cis-platinum in nude mice. *Jpn J Cancer Res.*, 91 : 91-98, 2000.
172. Barkats M, Bilang-Bleuel A, Buc-Caron MH, Castel-Barthe MN, Corti O, Finiels F, Horellou P, Revah F, Sabate O, Mallet J. Adenovirus in the brain : Recent advances of gene therapy for neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.*, 55 : 333-341, 1998.
173. Graham FL, Prevec L. Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. *Biotechnology*, 20 : 363-390, 1992.
174. Kozarski KF, Wilson JM. Gene therapy : Adenovirus vectors. *Curr Opin Genet Dev.*, 3 : 499-503, 1993.

Annexe

Chromatogramme du séquençage du gène MT cloné dans le plasmide recombinant pRev-TRE



Remerciements

Mon directeur de recherche Dr Wagner Yotov et mon co-directeur de recherche Dr Richard L. Momparler, pour leur gentillesse et leurs conseils.

Ma famille (Jean-François, Marie-Josée, Simon, Olivier, Margot et Louis) qui m'a supportée plus souvent qu'elle ne le croit et qui a démontré un intérêt à mes études.

Sylvie Cloutier, Hugo Hamel, Sarah Falconi, Leila Esmailzadeh, Christian Beauséjour, Oanh Lê, Veronica Bovenzi, Louise Momparler, Sepideh Shaker, Jacynthe Gagnon, Francine Dionne, Aurelia Orus, Mélanie Primeau, Stéphane Pinsonneault et Franziska Mueller qui ont contribué à ce climat de travail si accueillant.

Mes amis Michelle Scott et Jonathan Goyette.

La Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine pour la bourse de maîtrise.