

Université de Montréal

Étude de gènes suicides et de promédicaments
pour la thérapie génique du cancer

par
Caroline Trudeau

Département de pharmacologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en pharmacologie

Mars 2002

© Caroline Trudeau, 2002



W
4
U58
2002
v.084



Université de Montréal
Faculté des études supérieures


Cette thèse intitulée:

Étude de gènes suicides et de promédicaments
pour la thérapie génique du cancer

présentée par:

Caroline Trudeau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur:	Teresa Kus
Directeur de recherche:	Gérald Batist
Codirecteur:	Richard L. Momparler
Membre du jury:	Richard Bertrand
Examineur externe:	Maximilien Arella
Représentant du doyen de la FES:	

SOMMAIRE

Une approche pour améliorer la sélectivité de la chimiothérapie et en éliminer les effets secondaires systémiques, est de convertir les agents de chimiothérapie cytotoxiques en des promédicaments pouvant être activés dans un tissu spécifique. C'est ce que propose la thérapie génique du cancer, une alternative thérapeutique en développement à l'heure actuelle. Cette thèse est consacrée principalement à l'étude de différents systèmes de promédicaments activables par des gènes suicides, pour la thérapie génique du cancer.

Un nouveau gène suicide a été développé à partir du parasite *Trypanosoma brucei* (Tb). En effet, l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase exprimée par le parasite *Trypanosoma brucei* (TbHGPRT) peut convertir l'allopurinol (HPP), un analogue de purine, en des nucléotides correspondants avec une plus grande efficacité que son homologue humain. L'aspect le plus intéressant de TbHGPRT est sa sélectivité pour des lignées de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC), une caractéristique démontrée avec des tests de cytotoxicité *in vitro*. Le clonage d'un autre gène suicide prometteur de Tb, l'adénylosuccinate synthétase aussi capable de métaboliser l'HPP ou un dérivé, a été entrepris. Des séquences consensus reliées à l'activité de ce gène ont été identifiées dans la région 5'.

L'expression de la protéine pénicilline amidase G (PGA) de *Escherichia coli* dans des cellules de mammifères, a aussi été étudiée en tant que gène suicide potentiel. Malgré la capacité de la PGA purifiée à activer un promédicament constitué d'un dérivé phénylacétamide de doxorubicine en une drogue cytotoxique, il a été impossible de

reconstituer son activité catalytique. Il est proposé qu'une enzyme PGA fonctionnelle a besoin d'un élément appartenant essentiellement à un environnement intracellulaire bactérien.

Enfin, une étude s'est penchée sur le promoteur hexokinase (HK), afin de développer des outils pour cibler uniquement les cellules cancéreuses et contrôler l'expression des gènes suicides. Il a été démontré que l'activité du promoteur HK est plus élevée chez les NSCLC, par rapport à un promoteur constitutif, lorsque son activité était plutôt réduite chez les cellules normales. Le but de cette étude était d'identifier les régions du promoteur HK qui étaient responsables de son activité dans des cellules cancéreuses de type NSCLC. Les tests effectués avec le gène rapporteur luciférase ont révélé une activité cinq à dix fois plus élevée dans une lignée NSCLC, pour les trois dernières délétions en décroissement progressif à partir de l'extrémité 5' du promoteur.

Les résultats de la présente thèse suggèrent qu'il existe toujours une possibilité de créer des outils innovateurs pouvant compléter ou améliorer les systèmes de thérapie génique déjà en application.

Mots clés: Allopurinol, adénylosuccinate synthétase, doxorubicine, hexokinase, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase, pénicilline amidase, poumon, rétrovecteur, trypanosome.

OVERVIEW SUMMARY

Conversion of cytotoxic chemotherapy agents to prodrugs that can be activated in a specific tissue target, is a potential approach to increase chemotherapy selectivity and overcome systemic side effects. Gene therapy for cancer offers such an alternative and it is a rapidly growing field of modern medicine. The goal of this thesis is to study different systems of prodrugs activated by suicide genes for gene therapy of cancer.

A novel suicide gene has been derived from the parasite *Trypanosoma brucei* (Tb). The enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase expressed by the parasite *Trypanosoma brucei* (TbHGPRT) can actually convert allopurinol (HPP), a purine analogue, to corresponding nucleotides with greater efficiency than its human homologue. The most striking aspect of TbHGPRT is its selectivity for non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cell lines. This has been demonstrated with the cytotoxicity assays conducted *in vitro*. The cloning of another promising suicide gene from Tb, the adenylosuccinate synthetase gene, has been started. This gene also has the capacity to use HPP or a derivative as substrates. Consensus sequences linked to the activity of this gene have been identified in the 5' region.

The gene responsible for the expression of the enzyme penicillin G amidase (PGA) of *Escherichia coli* in mammalian cells, has also been examined as a potential suicide gene. Despite the capacity of the purified PGA to activate a prodrug made of a phenylacetamide derivative of doxorubicin into a cytotoxic drug, it has been impossible

to reconstitute its catalytic activity. It has been suggested that a functional PGA enzyme might require an element that belongs to the bacterial intracellular environment.

A last study focused on the hexokinase (HK) promoter, since there is a need to develop tools to target only cancer cells and to control the expression of suicide genes. The activity of the HK promoter has been demonstrated to be more intense in NSCLC, compared with a constitutive promoter, when it was very low in normal cells. The goal of this study was to identify the regions of the HK promoter that are responsible for its activity in NSCLC. The results of the luciferase assay showed an activity five to ten times higher in NSCLC, for the last three 5' progressive deletions.

The results of this thesis support the fact that innovative tools can always be created to improve the actual gene therapy systems.

Key words: Allopurinol, adenylosuccinate synthetase, doxorubicin, hexokinase, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, lung, penicillin amidase, retrovector, trypanosome.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
OVERVIEW SUMMARY.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTES DES FIGURES.....	xiv
LISTE DES SIGLES.....	xvii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xviii
DÉDICACE.....	xxiii
REMERCIEMENTS.....	xxiv

PREMIÈRE PARTIE: INTRODUCTION

AVANT-PROPOS.....	2
CHAPITRE 1: La thérapie génique: principes et stratégies.....	4
1.1 Historique et définition.....	4
1.2 Différentes stratégies utilisées en thérapie génique du cancer.....	6
1.2.1 Le remplacement des gènes suppresseurs de tumeur.....	7
1.2.2 L'inactivation des oncogènes.....	9
1.2.3 L'introduction de molécules pro-apoptotiques.....	10
1.2.4 L'immunomodulation.....	11
1.2.5 L'activation de promédicaments.....	12
1.3 Les gènes suicides.....	13
1.3.1 Description du gène suicide idéal.....	14

1.3.2 Description du promédicament idéal.....	16
1.3.3 L'effet de voisinage.....	17
1.3.4 La spécificité tumorale de l'expression.....	19
1.3.5 La localisation cellulaire de l'enzyme.....	21
1.4 Exemples de systèmes d'activation de promédicaments par des gènes gènes suicides.....	22
1.4.1 Le ganciclovir et la thymidine kinase virale.....	23
1.4.2 La 5-fluorocytosine et la cytosine déaminase bactérienne.....	25
CHAPITRE 2: Présentation de trois systèmes potentiels de promédicaments activables par des gènes suicides.....	28
2.1 La prodoxorubicine et le gène suicide bactérien pénicilline amidase.....	28
2.1.1 Synthèse de la prodoxorubicine.....	28
2.1.2 La doxorubicine.....	32
2.1.3 La pénicilline amidase bactérienne.....	35
2.1.3.1 Description.....	35
2.1.3.2 Applications antérieures en thérapie génique.....	36
2.2 L'allopurinol et le gène suicide hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase de parasite.....	37
2.2.1 L'allopurinol.....	37
2.2.2 L'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase de parasite.....	42
2.2.2.1 Description.....	42

2.2.2.2 Applications antérieures en thérapie génique.....	43
2.3 L'allopurinol, l'allopurinol riboside et le gène suicide	
adénylosuccinate synthétase de parasite.....	44
CHAPITRE 3: Principaux vecteurs utilisés en thérapie génique.....	45
3.1 Les vecteurs non viraux.....	46
3.2 Les vecteurs viraux.....	49
3.2.1 Les parvovirus.....	49
3.2.2 Les virus vaccinia.....	50
3.2.3 Les adénovirus.....	51
3.2.4 Les lentivirus.....	52
3.3 Les rétrovirus.....	52
3.3.1 Le cycle de vie.....	53
3.3.2 Le fonctionnement des rétrovecteurs.....	54
3.3.3 Les avantages et les désavantages des rétrovecteurs.....	56
CHAPITRE 4: L'usage des promoteurs en thérapie génique.....	59
4.1 Les promoteurs spécifiques de tumeur.....	60
4.1.1 Les promoteurs ciblant le poumon.....	62
4.2 Les promoteurs inductibles pour le cancer.....	65
CHAPITRE 5: Les objectifs de la présente thèse.....	67

DEUXIÈME PARTIE: PRÉSENTATION DES ARTICLES

CHAPITRE 6: A Study on the Expression of Penicillin G Amidase to	
Activate a Doxorubicin Prodrug.....	69

Résumé.....	70
Abstract.....	71
Introduction.....	72
Materials and Methods.....	73
Results and Discussion.....	83
Acknowledgments.....	94
References.....	94
Déclaration des coauteurs de l'article.....	98

CHAPITRE 7: A Novel Parasite-Derived Suicide Gene for Cancer Gene

Therapy with Specificity for Lung Cancer Cells.....	99
Résumé.....	100
Abstract.....	101
Introduction.....	102
Materials and Methods.....	103
Results and Discussion.....	109
Acknowledgments.....	122
References.....	123
Déclaration des coauteurs de l'article.....	127
Permission de l'éditeur.....	128

CHAPITRE 8: Genomic Cloning of the 5' Region of the Adenylosuccinate

Synthetase Gene of <i>Trypanosoma brucei</i>	129
Résumé.....	130
Abstract.....	131

Introduction.....	132
Materials and Methods.....	133
Results and Discussion.....	134
Acknowledgments.....	136
References.....	140
CHAPITRE 9: A Study of the Specificity of the Hexokinase Type II	
Promoter for Cancer Cells.....	142
Résumé.....	143
Abstract.....	145
Introduction.....	147
Materials and Methods.....	148
Results and Discussion.....	150
Acknowledgments.....	152A
References.....	158
Déclaration des coauteurs du résumé.....	159
Permission de l'éditeur.....	160
TROISIÈME PARTIE: CONCLUSION	
CHAPITRE 10: Discussion générale.....	162
10.1 Évaluation du gène suicide PGA et de la prodox (article 1)....	162
10.2 Évaluation du gène suicide TbHGPRT et de l'HPP (article 2)..	165
10.3 Évaluation du gène suicide potentiel TbASS (article 3).....	173
10.4 Évaluation de l'étude sur le promoteur HK (article 4).....	177

10.5 Conclusion.....	181
BIBLIOGRAPHIE.....	182
ANNEXE 1: Expériences en supplément.....	xxv
ANNEXE 2: Implication de la candidate dans les travaux présentés.....	xxviii
CURRICULUM VITAE.....	xxxiii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Exemples de gènes suicides provenant de différentes espèces.....	15
Tableau 7.1	Summary of allopurinol modulation by TbHGPR1 on different cell lines.....	113
Tableau 9.1	Transcription factors (and other elements) linked to DNA motifs identified in the fragments of the HK promoter after the 5' progressive deletions.....	156A

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Répartition des protocoles de thérapie génique par maladie.....	6
Figure 1.2	Répartition des protocoles de thérapie génique par type de gène.....	7
Figure 1.3	Schéma d'un système d'activation d'un promédicament en une drogue toxique.....	27
Figure 2.1	Structure moléculaire de la prodox et libération de la dox suite à l'activation par l'enzyme PGA.....	29
Figure 2.2	Spectres de masse de la prodox et de la dox obtenus par la technique electrospray.....	30
Figure 2.3	Vérification de la pureté de la prodox et de la dox obtenue par la technique HPLC.....	31
Figure 2.4	L'effet cytotoxique de la dox suite à l'activation de la prodox par la PGA chez les cellules MCF7 (test colorimétrique MTT).....	34
Figure 2.5	Structures moléculaires de l'hypoxanthine, la 6-mercaptapurine, l'allopurinol, la guanine et la 6-thioguanine.....	38
Figure 2.6	Le rôle de l'HPP dans l'inhibition de la XO.....	40
Figure 3.1	Répartition des protocoles de thérapie génique par type de vecteur.....	46
Figure 3.2	Schéma du transfert d'un rétrovecteur dans une lignée cellulaire d'encapsulation pour la production de rétoparticules.....	58
Figure 6.1	Chemical structures of prodoxorubicin and doxorubicin.....	74
Figure 6.2 (A)	Schematic representation of the constructs that encode PGA, α or β subunit.....	84
Figure 6.2 (B and C)	RT-PCR analysis of the cells transduced with the PGA, α or β construct.....	85

Figure 6.3	Cell survival after treatment with dox or its phenylacetamide derivative prodox.....	87
Figure 6.4 (A)	Schematic representation of the constructs that encode a fusion protein.....	89
Figure 6.4 (B)	Western blot and immunoprecipitation analysis of fusion protein expression in COS-1 cells (<i>flag</i> antibody).....	90
Figure 6.4 (C)	Western blot and immunoprecipitation analysis of fusion protein expression in COS-1 cells (<i>myc</i> antibody).....	91
Figure 6.5	Diffuse cytoplasmic localization of the <i>flag</i> α or β <i>myc</i> fusion protein (immunochemistry).....	92
Figure 7.1(A)	Schematic representation of the pTbiGFP construct.....	110
Figure 7.1 (B and C)	Western blot analysis of TbHGPRT protein expression in cells transduced with the pTbiGFP construct.....	111
Figure 7.2	Diffuse cytoplasmic localization of the TbHGPRT protein after the A549 cells were prepared for immunochemistry.....	112
Figure 7.3 (A-C)	Cell survival after treatment with allopurinol for cell lines A549, M27, and H460.....	115
Figure 7.3 (D-F)	Cell survival after treatment with allopurinol for cell lines DA3, ZR75, and MDA231.....	116
Figure 7.4	[³ H]Allopurinol uptake by A549, H322, and DA3 cells transduced with TbHGPRT.....	117
Figure 7.5	Apoptosis induction by allopurinol on A549 cells transduced with TbHGPRT or AP2.....	119
Figure 8.1	Schematic representation of the purine salvage pathway in human and of the production of allopurinol nucleotide in trypanosome.....	137

Figure 8.2	Consensus nucleotide sequence of the 5' region of the TbASS gene and the derived amino acid sequence.....	138
Figure 8.3	ASS amino acid sequence alignment (partial) of several species.....	139
Figure 9.1 (A)	Schematic representation of the 5' progressive deletions of the HK promoter.....	153
Figure 9.1 (B)	Luciferase assay results in cell lines transfected with the full HK promoter and 5' progressive deletions.....	154
Figure 9.2 (A)	Schematic representation of the 5A(K-L) construct.....	155
Figure 9.2 (B)	Luciferase assay results in cell lines transfected with the 5A-(K-L) construct.....	156
Figure 9.3	Gel mobility assays of fragments K, L, and (K-L).....	157
Figure A.1	Localisation cellulaire de la protéine TbHGPRT dans les cellules DA3 (immunochimie).....	xxvi
Figure A.2	Confirmation de l'expression de la protéine TbHGPRT chez la souris C57BL/6 (transfert Western: extraits de tumeurs).....	xxvii

LISTE DES SIGLES

α	alpha
β	bêta
g	gramme
K_{cat}	constante catalytique
kDa	kilodalton
K_m	constante de Michaelis (affinité pour un substrat)
IC_{50}	concentration inhibitrice pour 50% des cellules
M	mole par litre (molaire)
mg	milligramme
ml	millilitre
mm	millimètre
mmol	millimole
nm	nanomètre
P	<i>probability value</i>
μCi	microCurie
μg	microgramme
μl	microlitre
μM	micromole par litre
$^{\circ}\text{C}$	degré Celsius (Centigrade)

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AAV	virus adéno-associé
ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
ADEPT	<i>antibody-directed enzyme prodrug therapy</i>
ADN/DNA	acide désoxyribonucléique/ <i>deoxyribonucleic acid</i>
ADNc/cDNA	acide désoxyribonucléique complémentaire/ <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
AFP	alpha fétoprotéine
AMP	adénosine monophosphate
6-APA	acide 6-aminopénicillanique
APPR-MP	4-aminopyrazolo [3,4- <i>d</i>] pyrimidine ribonucléotide
ARN/RNA	acide ribonucléique/ <i>ribonucleic acid</i>
ASL	anénylosuccinate lyase
ASS	adénylosuccinate synthétase
AVP	arginine vasopressine
bp/pb	<i>base pair</i> /paire de bases
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CAL	calrétinine
CAR	<i>coxsackie/adenovirus receptor</i>
CAT	chloramphénicol acétyl transférase
CD	cytosine désaminase
CEA	antigène carcinoembryonnaire
cfu	<i>colony forming unit</i>

CMV	cytomégalo vi rus
Cx	connexine
CYP	cytochrome
DIC	<i>differential interference channel</i>
dox	doxorubicine
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
5-FC	5-fluorocytosine
flt-1	<i>vascular endothelial growth factor receptor type 1</i>
5-FU	5-fluorouracile
GCV	ganciclovir
GDEPT	<i>gene-directed enzyme prodrug therapy</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
GMP	guanosine monophosphate
<i>gpt</i>	voir XGPRT
GRP	<i>gastrin-releasing peptide</i>
GS	gène suicide
GTP	guanosine triphosphate
HGPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
HIV-1, HIV-2	virus de l'immunodéficience humaine de type 1 ou 2
HK	hexokinase de type II

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPP	allopurinol
HPPR-MP	4-hydroxypyrazolo [3,4- <i>d</i>] pyrimidine ribonucléoside
HSP	<i>heat shock proteins</i>
HSV-1	virus de l'herpès simplex de type 1
IFN- γ	interféron gamma
IL	interleukine
IMP	inosine monophosphate
IP	intrapéritonéal
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kb	kilobase
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MLV	<i>murine leukemia virus</i>
m.m.	masse moléculaire
6-MP	6-mercaptopurine
MS	<i>mass spectroscopy</i>
MTT	bromure de diphényltétrazolium
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide (réduit)
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit)
NHBE	cellules humaines normales épithéliales de bronches
NSCLC	<i>non-small cell lung carcinoma</i>
ODN	oligodéoxynucléotide
p53	protéine 53

PAV	pénicilline amidase V
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PEI	polyéthylène imine
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PGA	pénicilline amidase G
PLL	poly-L-lysine
PPE-1	préproendothéline de type 1
PPi	pyrophosphate inorganique
pRb	protéine rétinoblastome
prodox	prodoxorubicine
PRPP	phosphoribosyl pyrophosphate
PS	<i>penicillin-streptomycin</i>
PSA	<i>prostate-specific antigen</i>
RT	transcriptase inverse
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SC	sous cutané
SCLC	<i>small cell lung carcinoma</i>
SE	<i>standard error</i>
SRB	sulforhodamine B
Tb	<i>Trypanosoma brucei</i>
TbASS	adénylosuccinate synthétase de <i>Trypanosoma brucei</i>
TbHGPR	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase de <i>Trypanosoma brucei</i>

6-TG	6-thioguanine
TK	thymidine kinase
TRP-1	<i>tyrosinase-related protein 1</i>
UPRT	uracil phosphoribosyltransférase
VDEPT	<i>virally directed enzyme prodrug therapy</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VSVG	<i>vesicular stomatitis virus G</i>
WT	<i>wild type</i>
XGPRT	xanthine-guanine phosphoribosyltransférase
XO	xanthine oxidase

À tous ceux qui ont soif de démocratie afin d'améliorer leurs connaissances

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier de tout mon cœur mes parents, Éliisa et Gaétan, qui sont des survivants du cancer. Grâce à leur tolérance, leur encouragement constant, et surtout leur intérêt, ils ont rendu possible la réalisation de mon Ph.D. Je remercie mes collègues de laboratoire de l'Institut Lady Davis de recherches médicales, avec une attention spéciale pour Dr Ala-Eddin Al Moustafa, Dr Naciba Benlimame, Dr Nicoletta Eliopoulos, Dr Nasser Fotouhi-Ardakani, madame Maité Hernandez et Dr Iris Jaitovitch-Groisman, pour leur amitié sincère et leurs vastes connaissances.

Mes pensées sont avec Dr Moulay Alaoui-Jamali de l'Institut Lady Davis, qui a toujours su se rendre disponible pour m'enseigner l'art de rédiger un article scientifique. Je remercie chaleureusement Dr Richard Momparler de l'Hôpital Ste-Justine, qui a bien voulu m'accueillir parmi son groupe de lecture. Je remercie Dr Gérald Batist du Centre de recherches appliquées sur le cancer de l'Université McGill, qui m'a donné la possibilité de faire un Ph.D. dans son laboratoire et de présenter mes travaux dans plusieurs conférences de calibre international.

Je n'insisterai jamais assez sur l'excellence du Département de pharmacologie de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal, qui a grandement contribué à ma formation scientifique. Je ne voudrais pas oublier de mentionner la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal, pour son support financier.

PREMIÈRE PARTIE:

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS

Nous savons maintenant que le cancer est en partie le résultat d'un dérèglement du matériel génétique des cellules, ce qui conduit à un noyau cellulaire, une tumeur, possédant un contrôle anormal de la croissance et de la division cellulaire (Salmon et Sartorelli, 1998; Meng et El-Deiry, 1999). Malgré le succès de la chimiothérapie à combattre plusieurs types de tumeurs rares et les progrès à combiner les traitements conventionnels à des agents immunomodulateurs comme l'interféron, il demeure que les agents de chimiothérapie ont une efficacité limitée. Le peu d'impact sur les tumeurs solides, surtout lorsqu'elles ont progressé au stade de métastases, la résistance des cellules tumorales dès le début du traitement ou qui s'installe graduellement, et le fait que les agents de chimiothérapie ne soient habituellement efficaces qu'à des doses élevées (index thérapeutique étroit), ce qui amène une toxicité considérable auprès des patients, sont tous des problèmes des agents de chimiothérapie conventionnels (Gutierrez *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1994; Nygren, 2001).

La majorité des agents anti-néoplasiques agissent en empêchant la prolifération des cellules. Leur action est dirigée sur la division cellulaire ou à une phase spécifique du cycle cellulaire, plutôt que d'agir par une toxicité spécifique pour un type de cancer particulier. Ces agents anti-néoplasiques exercent alors un effet toxique sur les tissus normaux ayant un taux de division cellulaire rapide, comme la moelle osseuse, la muqueuse intestinale et le système lymphatique (Connors et Knox, 1995; Marais *et al.*, 1996). De plus, la plupart des tumeurs solides qui représentent plus de 85% des cancers humains (Huebner *et al.*, 1999), n'ont pas une proportion élevée de cellules qui

prolifèrent rapidement et ne sont donc pas spécialement sensibles à ces agents. Il a déjà été évalué que pour obtenir un effet thérapeutique sur les tumeurs solides les plus résistantes, il faudrait une dose totale de plus de cent fois la dose clinique normalement utilisée (Connors et Knox, 1995). Les agents de chimiothérapie actuellement utilisés en clinique sont donc restreints par leur manque de spécificité pour les cellules cancéreuses et conséquemment, ils endommagent aussi les tissus normaux (Deonarain *et al.*, 1995).

C'est dans cette perspective afin de mieux cibler les cellules cancéreuses que la thérapie génique offre une alternative intéressante pour les éliminer. L'introduction de gènes bactériens ou viraux, dont les enzymes peuvent bioactiver des promédicaments non toxiques en des médicaments cytotoxiques, a déjà fait ses premières preuves. L'utilisation de systèmes contenant des séquences régulatrices (promoteurs) permettant l'expression de gènes dits suicides, uniquement dans les cellules cancéreuses, pourrait compléter les traitements de chimiothérapie dans l'avenir et peut-être même les substituer dans certains cas.

CHAPITRE 1: La thérapie génique: principes et stratégies

1.1 Historique et définition

La thérapie génique consiste à fournir une information génétique au patient, afin de modifier les caractéristiques de certaines de ses cellules, dans le but d'apporter un traitement (Deonarain *et al.*, 1995). C'est un élargissement du concept de la pharmacologie classique où l'on administre un médicament. De façon générale, trois éléments sont requis en thérapie génique: 1) l'information génétique, i.e. des séquences codantes dans plusieurs cas pour une protéine d'intérêt et des éléments de régulation comme un promoteur; 2) les cellules ciblées qui sont les cellules tumorales elles-mêmes ou dans certains cas, les cellules du système immunitaire qui vont agir sur les cellules tumorales; et 3) le système de délivrance du matériel génétique d'intérêt dans les cellules ciblées, soit un vecteur d'origine virale ou un vecteur non viral comme les liposomes. Ces derniers sont des systèmes de membranes artificielles ou de lipides cationiques permettant la diffusion du matériel génétique qu'ils enrobent.

Le concept de la thérapie génique provient de l'observation que certaines maladies sont causées par la transmission d'un seul gène qui n'est pas fonctionnel. L'insertion cellulaire d'une copie exprimant la protéine normale nécessaire au fonctionnement de l'organisme pourrait alors contrecarrer la maladie et corriger la situation. C'est en réalisant cette hypothèse que la thérapie génique a acquis sa première notoriété aux États-Unis, lors d'essais cliniques sous la supervision de French Anderson. La patiente, une fillette de quatre ans, souffrait d'une grave déficience du système immunitaire causée par un gène

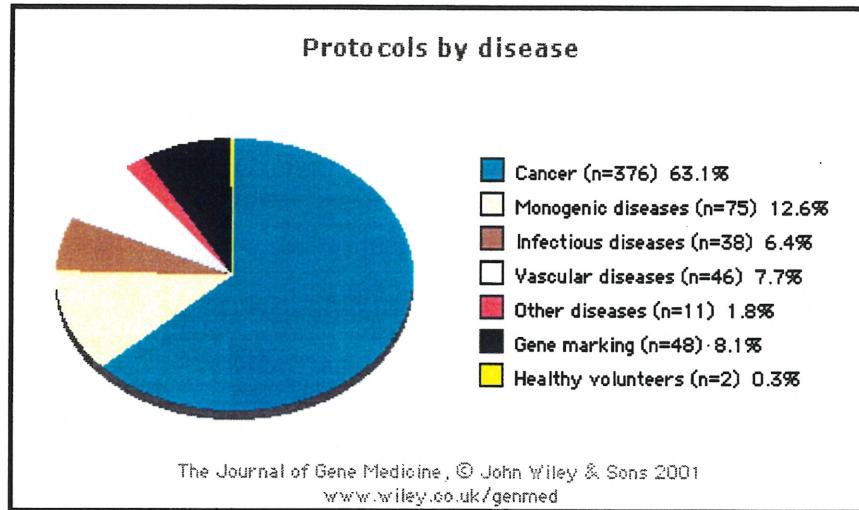
par un gène défectueux (adénosine déaminase), empêchant la production d'une enzyme vitale qui déclenche normalement une série de réactions biochimiques essentielles au fonctionnement de ses défenses naturelles. Des lymphocytes T furent extraits et exposés (*ex vivo*) à des copies normales du gène en question, grâce à une transduction avec un vecteur rétroviral. Après une croissance et une sélection *in vitro* de clones contenant une copie fonctionnelle du gène, les cellules enrichies ont été réintroduites dans le système circulatoire de la patiente. Les cellules maintenant porteuses d'un gène normal ont commencé à produire leur propre enzyme et la fillette a pu mener une enfance relativement normale (Gutierrez *et al.*, 1992; Roth et Cristiano, 1997; Gunji *et al.*, 2000). Depuis cette réussite, beaucoup d'espoirs se sont donc appuyés sur la thérapie génique.

La thérapie génique s'applique à deux catégories d'affections:

- 1) Les maladies héréditaires où un gène défectueux (récessif) peut être remplacé pour corriger la déficience (par exemples: le facteur de coagulation IX déficient dans l'hémophilie; l'hémoglobine non fonctionnelle dans l'anémie);
- 2) Les maladies acquises comme le sida, les affections cardio-vasculaires et le cancer. Le traitement du cancer est différent de celui pour les maladies génétiques, puisqu'une approche efficace pour l'enrayer requière une élimination complète de toutes les cellules cancéreuses.

De nos jours, plus de 50% des protocoles de thérapie génique sont destinés au cancer et environ 12% concernent des maladies impliquant un seul gène, entraînant souvent une grave déficience (Figure 1.1, p. 6; The Journal of Gene Medicine, 2001).

Figure 1.1 Répartition des protocoles de thérapie génique par maladie



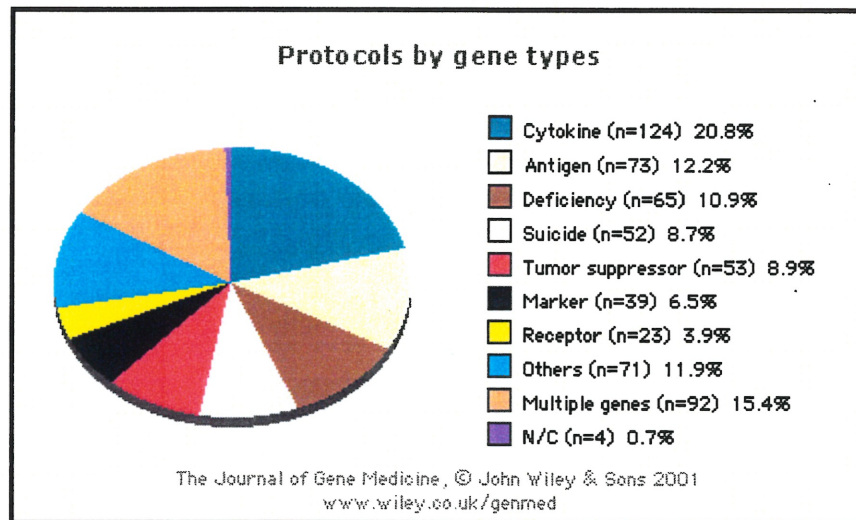
(Cette image est reproduite avec la permission de John Wiley & Sons, The Journal of Gene Medicine, site web <http://www.wiley.co.uk/genmed>.)

1.2 Différentes stratégies utilisées en thérapie génique du cancer

En thérapie génique du cancer, différentes approches ont des cibles génétiques ou immunologiques. Ces stratégies sont regroupées en cinq catégories et sont décrites dans les paragraphes qui suivent. Certaines d'entre elles ont été testées en combinaison avec de la chimiothérapie et/ou de la radiothérapie. À titre d'exemple, une induction de l'apoptose a été observée dans le cas du carcinome du poumon non à petites cellules (*non-small cell lung carcinoma*; NSCLC), avec une injection intra-tumorale de vecteurs adénoviraux contenant le gène suppresseur de tumeur p53 et une administration concomitante de cisplatine (Roth, 1996). Une étude clinique de phase II a aussi démontré l'usage sécuritaire de p53 avec la radiothérapie (Roth *et al.*, 2001).

La Figure 1.2 montre une répartition des divers types de gènes utilisés dans les protocoles de thérapie génique, selon The Journal of Gene Medicine (2001).

Figure 1.2 Répartition des protocoles de thérapie génique par type de gène



(Cette image est reproduite avec la permission de John Wiley & Sons, The Journal of Gene Medicine, site web <http://www.wiley.co.uk/genmed>.)

1.2.1 Le remplacement des gènes suppresseurs de tumeur

Une altération dans l'expression des gènes contrôlant le cycle cellulaire peut s'avérer d'une importance critique dans la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents anticancéreux. L'apoptose, ce procédé d'élimination sélectif et contrôlé des cellules durant la différenciation et le développement cellulaire, ainsi que durant le vieillissement (Alnemri, 1997), est aussi intimement liée au développement des tumeurs. Une apoptose défectueuse peut mener à des cellules mutées persistantes qui normalement auraient dû être éliminées, aussi bien qu'à la résistance aux traitements de chimiothérapie. Les gènes suppresseurs de tumeurs, impliqués dans le mécanisme normal de l'apoptose, sont donc

exploités en thérapie génique du cancer. L'exemple classique est le gène générant la protéine nucléaire rétinoblastome (pRb). Ceci est le premier gène suppresseur de tumeur à avoir été identifié comme ayant subi une mutation dans les tumeurs de type rétinoblastome, quoiqu'il ait aussi été retrouvé à l'état muté chez d'autres tumeurs comme l'ostéosarcome, le carcinome hépatocellulaire et le cancer du sein (Meng et El-Deiry, 1999). La pRb joue un rôle de gardien dans le passage de la phase G1 à S du cycle cellulaire et cela dépend normalement de son niveau de phosphorylation. Si pRb est hypophosphorylée, elle retient E2F, un facteur de transcription contrôlant plusieurs gènes de la phase S (comme la dihydrofolate réductase), dont l'expression est nécessaire aux cellules pour débiter et compléter cette phase (Hochhauser *et al.*, 1996; Kohn, 1996). Si pRb est hyperphosphorylée ou non fonctionnelle, le facteur E2F est toujours libre de stimuler la cellule à entrer en phase S. Des expériences *in vivo* ont montré que l'introduction du gène normal Rb chez des souris, a diminué le volume des tumeurs et a prolongé leur survie (Riley *et al.*, 1996).

Le plus connu des gènes suppresseurs, en thérapie génique du cancer, est sans doute p53 qui arrête la progression du cycle cellulaire lorsque l'ADN est endommagé (Nelson et Kastan, 1994; Kastan *et al.*, 1995; Kaufmann et Paules, 1996; O'Connor *et al.*, 1997). Des anomalies du gène p53 sont fréquemment présentes dans les cancers du côlon, du pancréas, du poumon et du sein. D'ailleurs, le syndrome de Li-Fraumeni caractérisé par une mutation du gène p53, démontre une incidence élevée de tumeurs malignes (Martinet *et al.*, 2001).

De nombreux essais en thérapie génique ont été faits avec l'introduction de p53 à l'aide de vecteurs d'origine adénovirale ou rétrovirale. Les premières études cliniques faites par

les groupes de Roth (1996) et de Swisher (1999) ont donné des résultats positifs chez des patients souffrant d'un cas de NSCLC qui avait préalablement résisté à des traitements conventionnels.

Contrairement aux oncogènes dont il sera question dans le prochain paragraphe, les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeur doivent être éliminés ou inactivés pour induire la croissance d'une tumeur. L'introduction d'une seule copie fonctionnelle d'un gène suppresseur de tumeur dans les cellules devrait donc suffire pour rétablir une croissance normale (Swisher et Roth, 2000). Ce facteur est une cible importante, puisque la perte de fonction de p53 par mutation ou par délétion, possède une incidence de près de 50% dans les tumeurs humaines (Arcamone *et al.*, 1997).

1.2.2 L'inactivation des oncogènes

Les oncogènes, ces gènes jouant un rôle important dans la carcinogenèse à la suite d'une modification telle qu'une mutation ponctuelle (*K-ras* dans l'adénocarcinome du pancréas), une translocation (*myc* dans les lymphomes) ou encore, une amplification du nombre de copies (*c-erbB-2* dans le cancer du sein), sont également une cible potentielle pour la thérapie génique du cancer (Huebner *et al.*, 1999). La stratégie consiste à introduire dans la cellule un oligodéoxynucléotide (ODN) antisens (communément appelé «antisens»), dont la séquence d'ADN va complémentariser l'ARN messager de l'oncogène ciblé. Une fois le complexe ARN-ADN formé, la traduction du message sera empêchée et il y aura une dégradation de la molécule (Gutierrez *et al.*, 1992; Calabretta, *et al.*, 1999; Swisher et Roth, 2000). À cause de l'ampleur des mutations de *ras* dans la leucémie, mais aussi de l'inactivation liée à d'autres oncogènes tels que *bcr-abl* et *c-myb*,

les ODNs ont été suggérés pour les traitements *ex vivo* des cellules de la moelle osseuse (Calabretta *et al.*, 1999; Reuter *et al.*, 2000).

1.2.3 L'introduction de molécules pro-apoptotiques

Une autre stratégie thérapeutique implique le transfert et l'expression de molécules pro-apoptotiques. La famille la plus connue de ces gènes est sans aucun doute *bcl-2*. Quant au gène *bcl-2* comme tel, il joue un rôle dans le développement de plusieurs tumeurs, puisqu'un niveau élevé de la protéine a été retrouvée dans de nombreuses situations: chez 20% et 70% de patients souffrant de leucémie aiguë myéloblastique et de leucémie lymphoïde chronique, respectivement (Simonian *et al.*, 1997), et dans une autre étude, dans 70% des spécimens de cancer du sein (Sakakura *et al.*, 1997). En effet, on rapporte que *bcl-2* et *bcl-X_L*, les prototypes anti-apoptotiques de cette famille, bloquent les caspases qui sont normalement activées par les agents de chimiothérapie et d'autres conditions de stress cellulaire (Simonian *et al.*, 1997). Malgré l'habileté de *bcl-2* à inhiber l'apoptose, cette capacité peut être modifiée par les autres membres pro-apoptotiques de cette famille qui s'y lient, comme *bak* et *bax* (Reed, 1997; Simonian *et al.*, 1997; Strasser *et al.*, 2000). C'est la proportion relative de ces différentes protéines qui va déterminer la survie de la cellule; par exemple, *bcl-2* et *bax* peuvent former des hétérodimères et c'est le ratio *bcl-2:bax* qui sera déterminant (Ellis *et al.*, 1997; Reed, 1997; Sakakura *et al.*, 1997).

Le mésothéliome de la plèvre demeure difficile à enrayer avec toutes les thérapies conventionnelles: chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie. De telles cellules ont été transduites *in vitro* avec des vecteurs adénoviraux contenant *bak* et l'expression de ce

gène a induit l'apoptose et diminué la viabilité cellulaire, tant chez des cellules sensibles ou résistantes à p53 (Pataer *et al.*, 2001). Cette application de la thérapie génique utilisant des molécules pro-apoptotiques pourrait devenir un outil thérapeutique innovateur. Aussi, des cellules humaines de cancer du sein qui avaient une faible expression de *bax*, ont vu leur sensibilité à certains agents anticancéreux (cisplatine et étoposide) augmenter, après le transfert de ce même gène (Sakakura *et al.*, 1997). Cela suggère que la surexpression de *bax* puisse être l'un des facteurs déterminants pour moduler la chimiosensibilité des cellules cancéreuses.

1.2.4 L'immunomodulation

Le transfert de gènes exprimant des cytokines ou d'autres molécules immunomodulatrices, peut augmenter le potentiel de reconnaissance de la tumeur par le système immunitaire. Plusieurs études faites sur les animaux ont révélé que des cytokines dont les interleukines IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, et IL-18, ainsi que le *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) et l'interféron gamma (IFN- γ), ralentissaient le développement des tumeurs tout en stimulant les processus inflammatoires locaux et/ou la réponse immunitaire (McNeish *et al.*, 1997; Péron *et al.*, 1999; Gunji *et al.*, 2000). La prolifération et la différenciation des lymphocytes T seraient induites par l'IL-2 et l'IL-12. Quant à l'IFN- γ , il stimulerait les macrophages et l'expression des molécules du complexe d'histocompatibilité majeur à la surface des cellules cancéreuses (Martinet *et al.*, 2001).

À la lumière de résultats précliniques, certaines études ont été autorisées sur les humains. Un exemple remarquable est la thérapie génique *ex vivo* pour le cancer de la

prostate, afin de produire un vaccin (*tumor vaccination*) à partir de l'expansion d'une culture de cellules prélevées lors d'une chirurgie. Des vecteurs viraux sont utilisés pour enrichir les cellules avec l'IL-2 ou le GM-CSF, et elles sont irradiées avant la réintroduction chez le patient (Simons *et al.*, 1999). Le but est ainsi de provoquer une réponse immunitaire systémique face aux antigènes tumoraux (Baum *et al.*, 1999).

Malheureusement, ces stratégies semblent donner plus de résultats positifs avec les animaux. Cependant, il faut aussi souligner que plusieurs études sur des modèles précliniques démontrent une combinaison efficace de certaines cytokines avec un gène suicide. Une étude de Kwong *et al.* (1997) a démontré une plus grande régression d'une métastase hépatique de cancer du poumon et une prolongation de la survie avec une combinaison de l'IL-2 à un gène suicide, par rapport au groupe traité uniquement avec le gène suicide. Ces combinaisons demeurent une possibilité à développer pour la thérapie génique du cancer.

1.2.5 L'activation de promédicaments

Dans la littérature, cette approche est souvent désignée sous l'acronyme GDEPT pour *Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy*, ou VDEPT pour *Virally Directed Enzyme Prodrug Therapy*, lorsqu'un vecteur viral est utilisé pour transférer un gène produisant une enzyme activant un promédicament dans les cellules cancéreuses. En fait, la seule différence entre ces deux acronymes est que le premier cité implique à la fois des vecteurs viraux ou non viraux (Springer et Niculescu-Duvaz, 2000a). Cette stratégie est discutée avec de plus amples détails dans la section suivante, puisque c'est l'un des principes de base utilisé pour réaliser les objectifs expérimentaux de cette thèse.

1.3 Les gènes suicides

Le principe qu'une modification génétique des cellules composant une tumeur pourrait amener sa destruction en exposant ces mêmes cellules à un promédicament qui les rendraient vulnérables, a été démontré pour la première fois par Moolten en 1986 (Moolten, 1986; Black, 2001). Cette approche consiste en deux étapes (Marais *et al.*, 1996; Springer et Niculescu-Duvaz, 2000b; Beltinger *et al.*, 2001):

- 1) Le gène suicide exprimant une enzyme d'intérêt est inséré dans les cellules cancéreuses de façon à ne permettre l'expression spécifique de cette protéine que dans ces dernières;
- 2) L'administration d'un promédicament non toxique qui sera converti à un médicament cytotoxique par la présence de cette enzyme.

Puisque le gène suicide est normalement absent des cellules de mammifères pour s'assurer de sa spécificité, seules les cellules transfectées ou transduites avec le gène en question vont devenir susceptibles à la transformation du promédicament en une drogue toxique. Une des caractéristiques essentielles de ces systèmes d'activation est que l'enzyme ne s'exprime naturellement pas dans les cellules de mammifères ou très peu, et que les procaryotes peuvent fournir de telles enzymes (Deonarain et Epenetos, 1994; Marais *et al.*, 1996; Beltinger *et al.*, 2001). Les gènes suicides sont classifiés en deux catégories (Spencer, 2000; Springer et Niculescu-Duvaz, 2000b):

- 1) Ceux qui ne sont pas d'origine mammifère, avec ou sans homologue humain (exemple: la thymidine kinase virale);

- 2) Ceux qui produisent des enzymes d'origine humaine, mais qui sont absentes ou ne sont exprimées qu'à des concentrations très faibles dans les cellules ciblées (exemple: le CYP 450).

Le risque avec la première catégorie est d'obtenir une réponse immunitaire, surtout lors de certaines applications plus sensibles (i.e. réimplantation de cellules enrichies *ex vivo*), et c'est la raison pour laquelle certains chercheurs développent des gènes suicides d'origine humaine. Cependant, les enzymes humaines peuvent aussi causer des problèmes si elles sont exprimées en-dehors du site de la tumeur. Une solution à ce problème est de modifier un ou deux résidus du peptide, sans en altérer le site actif de façon à créer une enzyme humaine à 99.5%, sans toutefois avoir une spécificité humaine (Spencer, 2000).

Quelques exemples de gènes suicides provenant de différentes espèces sont décrits dans le Tableau 1.1 (p. 15). Les mécanismes d'action moléculaire de ces systèmes peuvent conduire à une mort par nécrose comme la combinaison ifosfamide/CYP 450 (Karle *et al.*, 2001), ou à une mort apoptotique telle que la combinaison ganciclovir (GCV)/thymidine kinase (TK) (Beltinger *et al.*, 2001). Plusieurs conditions sont souhaitables pour assurer l'activation efficace d'un promédicament par un gène suicide et elles sont discutées dans les paragraphes suivants.

1.3.1 Description du gène suicide idéal

Plusieurs caractéristiques sont requises pour être en présence d'un gène suicide idéal. Tout d'abord, l'enzyme produite doit être non toxique (Greco et Dachs, 2001; Knox, 2001). Jamais on n'insistera assez sur le fait que c'est la drogue qui est cytotoxique, c'est-

Gène suicide (espèce)	Promédicament	Mécanisme d'action	Condition requise	Références bibliographiques
Nitroréductase (<i>Escherichia coli</i>)	Moutardes 2,4-dinitrobenzamide, dont la CB 1954 [5-(azirin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide].	Alkylation de l'ADN <i>Cross-linking</i> de l'ADN	Co-substrat donneur d'électron (NADH/NADPH endogène)	McNeish <i>et al.</i> (1997) Grove <i>et al.</i> (1999) Spencer (2000) Greco et Dachs (2001) Knox (2001)
CYP 450; CYP 2B1 le plus actif. (humain, rat)	Cyclophosphamide; Ifosfamide.	Alkylation de l'ADN <i>Cross-linking</i> de l'ADN	Présence de NADH et O ₂	Chen et Waxman (1995) Chen <i>et al.</i> (1996) Chase <i>et al.</i> (1998) Löhr <i>et al.</i> (1998) Greco et Dachs (2001) Karle <i>et al.</i> (2001)
Carboxypeptidase G2 (<i>Pseudomonas</i>)	4-[(2-chloroéthyl)(2-méthoxyéthyl)amino]benzoyl-L acide glutamique (CMTA)	<i>Cross-linking</i> de l'ADN	Aucune	Marais <i>et al.</i> (1996) Spooner <i>et al.</i> (2000) Greco et Dachs (2001)
Peroxydase de raifort (plante)	Indole-3 acide acétique (phytohormone)	Non confirmé: <i>Adducts</i> dans l'ADN.	Non déterminé	Greco et Dachs (2001)
Déoxyribonucléoside kinase (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Déoxyribonucléosides naturels et analogues de nucléosides, dont la (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-déoxyuridine (BVDU).	Non confirmé: Faux précurseurs dans l'ADN.	Non déterminé	Zheng <i>et al.</i> (2001)

Tableau 1.1 Exemples de gènes suicides provenant de différentes espèces.

à-dire le résultat de l'activation du promédicament par l'enzyme suicidaire, et non pas l'enzyme elle-même qui tue les cellules. Aussi, afin d'éviter toute modification de la protéine, il est préférable de choisir des enzymes monomériques, de petit poids moléculaire, qui ne nécessitent pas de modification post-traductionnelle ou de glycosylation ou encore, qui n'ont pas besoin d'un co-facteur pour compléter l'activation du promédicament (Connors, 1995; McNeish *et al.*, 1997; Greco et Dachs, 2001). Évidemment, l'enzyme doit avoir le potentiel d'activer un substrat particulier, le promédicament.

1.3.2 Description du promédicament idéal

Le promédicament doit être spécifiquement activable par l'enzyme et cela doit se faire rapidement (K_{cat} élevé), à des concentrations basses (K_m bas) (Connors, 1995). Parmi les facteurs primordiaux, le promédicament doit diffuser facilement à travers les cellules tumorales et demeurer chimiquement stable (non toxique) jusqu'à son activation par l'enzyme (Connors, 1997; Springer et Niculescu-Duvaz, 2000b; Greco et Dachs, 2001). Connors (1997) suggère une augmentation du facteur de cytotoxicité de 100 fois, une fois le promédicament activé. Le caractère lipophile du promédicament va donc influencer la diffusion à travers les cellules, mais aussi la distribution dans les tissus. La demi-vie de l'agent cytotoxique est un facteur difficile à évaluer, puisqu'une longue demi-vie va permettre une distribution potentiellement plus homogène à travers la tumeur, quoique cela puisse laisser le risque d'un passage dans le compartiment vasculaire et augmenter la concentration systémique d'un élément cytotoxique (McNeish *et al.*, 1997). Finalement, la drogue activée ne devrait pas agir spécifiquement qu'à une seule phase du cycle cellulaire, car cela ralentit l'effet de toxicité. Aussi, on sait que

certaines cellules cancéreuses ne se divisent pas nécessairement de façon rapide (Connors, 1997; Knox, 2001).

En résumé, en ce qui concerne le choix du promédicament, il est préférable qu'il soit activable rapidement à très basse concentration et que la drogue relâchée soit efficace à la fois contre des cellules cancéreuses qui sont en interphase ou à n'importe quelle phase de leur cycle cellulaire (Knox *et al.*, 1993; Connors, 1995).

1.3.3 L'effet de voisinage

L'effet de voisinage, plus connu sous le nom de «*bystander effect*» dans la littérature, est un des facteurs limitant le succès d'un système d'activation de promédicament par un gène suicide. Ce phénomène se définit par la toxicité transmise à des cellules adjacentes qui n'ont pas été génétiquement modifiées, c'est-à-dire qui n'ont pas été transfectées ou transduites avec un gène suicide (Dilber et Smith, 1997). C'est un processus qui a été démontré *in vitro* et *in vivo*, et il est cliniquement important puisque toute la tumeur peut être théoriquement éliminée avec seulement une fraction des cellules tumorales qui ont été génétiquement modifiées (Dilber et Smith, 1997; Springer et Niculescu-Duvaz, 2000b). Il semblerait que l'effet de voisinage est le résultat de quelques mécanismes différents, dépendant du type de drogue utilisée. Tout d'abord, il a été observé que les métabolites toxiques formés après l'activation peuvent diffuser d'une cellule à l'autre par solubilité, par des vésicules apoptotiques ou par des jonctions intercellulaires. Cependant, ce dernier facteur (jonctions de type *gap*) ne serait pas essentiel, puisque les tumeurs ont souvent un nombre diminué de contacts entre les cellules et la diffusion de métabolites toxiques a tout de même été constatée (Springer et Niculescu-Duvaz, 2000a, 2000b; Greco et Dachs, 2001). Ceci est le cas des drogues diffusibles telles que la 5-FU,

la 6-mercaptopurine (6-MP), la cyclophosphamide et l'ifosfamide. Pour les analogues de purine et de pyrimidine nucléosides (comme le GCV et la cytosine arabinoside), il semblerait qu'un contact intercellulaire soit essentiel, car ces drogues ne sont pas diffusibles. Il a aussi été suggéré que le gène suicide lui-même (i.e. la TK) a pu être transmis par l'intermédiaire de vésicules apoptotiques phagocytées par des cellules adjacentes non génétiquement modifiées (Freeman *et al.*, 1993; Springer et Niculescu-Duvaz, 2000b; Black, 2001).

Vu l'importance de l'effet de voisinage dans le succès de la thérapie génique, plusieurs chercheurs tentent de trouver des moyens d'augmenter les jonctions de type *gap*. Ceci peut se faire en augmentant la production de connexine (Cx), dont la Cx43, des protéines membranaires considérées comme étant des composantes des jonctions de type *gap* (Carystinos *et al.*, 1999). L'augmentation des jonctions de type *gap* peut aussi se faire en utilisant des agents pharmacologiques comme l'acide rétinoïque et la lovastatine. L'acide rétinoïque augmente l'expression de la Cx43, et cela a été constaté *in vitro* comme *in vivo* (Bex *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1997). Quant à la lovastatine, elle augmente les jonctions de type *gap* en inhibant l'association de l'oncoprotéine p21 *ras* avec la membrane des cellules traitées (Ruch *et al.*, 1993). Plusieurs oncogènes, dont *ras*, sont connus pour diminuer ces jonctions et la lovastatine peut renverser cet effet. Cela se fait sans impliquer directement l'expression de la Cx43 (Cesen-Cummings *et al.*, 1998; Trosko et Chang, 2001).

Un autre facteur mis en cause dans l'effet de voisinage, est la présence d'un système immunitaire intact qui améliore l'efficacité des systèmes de gènes suicides. Ceci se ferait surtout par la libération de cytokines et non pas seulement localement, au site de la

tumeur, mais aussi à distance, ce qui peut avoir un impact dans le développement de métastases microscopiques (Springer et Niculescu-Duvaz, 2000b; Greco et Dachs, 2001).

Au stade de cette description sur les facteurs influençant l'efficacité des systèmes d'activation de promédicaments par des gènes suicides, il est intéressant de noter que plusieurs des systèmes maintenant parvenus au stade d'étude clinique, ne remplissaient pas nécessairement tous les critères idéaux décrits jusqu'à présent. À titre d'exemple, la combinaison GCV/TK, qui est sans doute la plus courante dans les études cliniques en thérapie génique suicide, utilise ce promédicament, le GCV, qui est actif spécifiquement à la phase S (i.e. réplication de l'ADN). Quant à la nitroréductase, maintenant en phase clinique I, et au CYP 450 qui a franchi la phase clinique II, ce sont des enzymes qui ont besoin de co-facteurs endogènes pour métaboliser leur substrat (se référer au Tableau 1.1, p. 15). Tout ceci pour dire que plusieurs combinaisons sont toujours réalisables malgré leurs faiblesses.

1.3.4 La spécificité tumorale de l'expression

Plusieurs études précliniques et cliniques ont été décevantes avec les gènes suicides, car les niveaux d'enzymes produites étaient insuffisants et ne s'exprimaient pas de façon spécifique dans un type de tumeur en particulier. Idéalement, l'expression du gène suicide ne devrait se produire que dans les cellules ciblées. Des stratégies ont été élaborées pour améliorer les systèmes existants. L'une d'entre d'elles utilisant un conjugué anticorps-enzyme est connu sous l'acronyme ADEPT, *Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*. L'enzyme responsable de l'activation est retenue à un anticorps monoclonal qui va reconnaître un antigène préférentiellement exprimé à la

surface d'une tumeur et va s'y lier. Ce conjugué anticorps-enzyme crée donc un environnement tumoral où une concentration élevée d'une enzyme peut convertir un promédicament normalement inactif en un métabolite très actif. Après un certain temps qu'on évalue que les conjugués non localisés à une tumeur ont été éliminés, un promédicament non toxique est administré et activé au site de la tumeur par l'enzyme qui demeure extracellulaire, car elle est toujours liée à l'anticorps. La drogue active, préférentiellement de bas poids moléculaire, peut alors diffuser rapidement et atteindre des régions de la tumeur qui ne sont pas accessibles aux conjugués anticorps-enzyme (Deonarain et Epenetos, 1994; Connors et Knox, 1995; Niculescu-Duvaz et Springer, 1997).

L'avantage de la technique ADEPT est le grand nombre de métabolites actifs pouvant être générés par seconde au site précis de la tumeur et cela, à partir d'une seule molécule d'enzyme (Connors et Knox, 1995; Deonarain *et al.*, 1995). Malheureusement, de nombreux désavantages ont aussi été rapportés, dont la pénétration peu efficace des anticorps dans les tumeurs solides et peu vascularisées, l'élimination trop lente des anticorps du compartiment vasculaire et l'hétérogénéité de l'expression des antigènes ciblés par les anticorps monoclonaux. Ces désavantages font que certaines cellules tumorales peuvent échapper à l'effet toxique du médicament, une fois le complexe activé. Aussi, l'immunogénicité relevant de la présence du conjugué anticorps-enzyme serait un désavantage majeur, puisque cela empêche une administration répétée (Bagshawe *et al.*, 1988; Deonarain et Epenetos, 1994; Niculescu-Duvaz et Springer, 1997; Spencer, 2000). À cause de ces désavantages, la technique ADEPT est délaissée et

il est rare de la voir dans des articles récents ou dans des conférences de thérapie génique. Aussi, il est préférable d'avoir une activation intracellulaire de l'enzyme, car cela permet de la concentrer davantage et d'obtenir une plus grande efficacité, donc une toxicité accrue pour éliminer les cellules cancéreuses (Deonarain *et al.*, 1995). Maintenant, les recherches s'orientent plutôt vers l'intégration de promoteurs spécifiques aux systèmes d'activation, pour obtenir la spécificité tumorale de l'expression du gène suicide.

Ces éléments régulateurs, les promoteurs, font que la transcription du gène suicide ne va se produire que dans un environnement sélectif, c'est-à-dire un certain tissu ou un type de tumeur (Knox *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1994; Marais *et al.*, 1996). À titre d'exemple, il a été possible de cibler certains tissus comme l'épithélium gastrointestinal, en clonant le promoteur du gène de l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) (Schrewe *et al.*, 1990). L'usage des promoteurs spécifiques en thérapie génique du cancer fera l'objet du Chapitre 4.

1.3.5 La localisation cellulaire de l'enzyme

Ce facteur est moins couramment mentionné dans la littérature, quoiqu'il ait tout de même de l'importance. Le site de l'expression de l'enzyme est un facteur déterminant pour la cytotoxicité du système. Théoriquement, l'activation intracellulaire d'un gène suicide semble préférable pour avoir une plus grande activation. Ceci a été démontré avec la carboxypeptidase G2 qui peut être exprimée à la surface des cellules ou dans le cytosol, afin d'activer un promédicament (Spooner *et al.*, 2000). L'expression du gène à la surface cellulaire amène une perte de l'activité, puisque la modification requise pour réaliser ce système amène une perte de la dimérisation de l'enzyme, sa forme naturelle à

l'état actif. Cependant, une autre étude démontre que les prédictions ne se réalisent pas toujours. Il avait été hypothétisé que la nitroréductase, une enzyme suicidaire qui requière la présence de co-facteurs NADPH pour l'activation, serait plus efficace à activer un promédicament dans la mitochondrie que dans le cytosol (Spooner *et al.*, 2001). De plus, la forme active de l'enzyme est un dimère et des études structurales ont révélé que 50% de la quantité de protéine produite était monomérique dans le cytosol et le noyau, tandis qu'elle était dimérique dans la mitochondrie. Il s'est avéré que les protéines distribuées dans le cytosol/noyau étaient plus actives à activer le promédicament que celles ciblées vers le compartiment mitochondrial, un environnement qui semblait plus favorable dès le départ. Ce dernier exemple démontre que des études structurales aident sûrement à planifier le développement d'un système, mais que l'approche empirique demeure toujours la meilleure, à mon avis.

Les éléments constituant un système de gène suicide activant un promédicament sont résumés de façon schématique à la Figure 1.3 (p. 27).

1.4 Exemples de systèmes d'activation de promédicaments par des gènes suicides

Cette section sur les gènes suicides serait incomplète si des exemples de systèmes d'activation n'étaient pas décrits. Les deux exemples suivants sont des cas «classiques», car ils sont non seulement les plus connus, mais aussi les plus utilisés dans la majorité des études cliniques pour la thérapie génique du cancer (Smythe, 2000; Black *et al.*, 2001).

1.4.1 Le ganciclovir et la thymidine kinase virale

Au cours des quinze dernières années, plus de 400 publications scientifiques ont discuté le potentiel de ce système pour la thérapie génique suicide du cancer (Greco et Dachs, 2001). La TK du virus de l'herpès simplex type 1 (HSV-1) convertit les analogues de nucléosides (guanosine), comme le GCV, à des formes monophosphates par la phosphorylation, qui sont ensuite converties en diphosphates et triphosphates par des enzymes cellulaires endogènes qui prennent la relève (Black *et al.*, 2001; Greco et Dachs, 2001). Le GCV, utilisé comme antiviral, est un pauvre substrat pour la thymidine kinase humaine, mais peut être transformé en GCV-monophosphate avec une efficacité 1000 fois plus grande par la TK de HSV-1. Les GCV-triphosphates sont toxiques. Ils entrent en compétition avec la déoxyguanosine triphosphate pour l'incorporation dans l'ADN lors de la division cellulaire, ce qui provoque une inhibition de l'ADN polymérase et des bris dans les brins d'ADN (Elion, 1983; Mar *et al.*, 1985). Puisqu'il y a des dommages dans l'ADN, les cellules entrent en apoptose, mais qui serait indépendante de p53 (Wallace *et al.*, 1996).

Le rôle de p53 dans ce mécanisme d'action conduisant à la mort cellulaire est tout de même controversé. Une étude récemment publiée par Beltinger *et al.* (2000) démontre l'accumulation de p53, suite aux lésions faites à l'ADN nucléaire. Cette accumulation de p53 était réduite chez les cellules transfectées avec *bcl-2*, une molécule anti-apoptotique. L'accumulation de p53 était encore plus réduite lorsque la synthèse protéique des mitochondries était bloquée par le chloramphénicol chez ces mêmes cellules traitées avec GCV/TK. Cela suggère que la mitochondrie puisse être impliquée dans

l'accumulation de p53 en présence de GCV, mais en l'absence de lésions détectables à l'ADN mitochondrial. De plus, cette étude a mis en évidence l'activation de la caspase initiateur 8 de l'apoptose, même si *bcl-2* était surexprimé. Ce résultat confirme l'existence d'une voie indépendante, en amont de la mitochondrie, possiblement liée aux récepteurs CD95 chez les cellules traitées avec GCV/TK.

L'intérêt pour le système GCV/TK provient aussi de son effet de voisinage. C'est avec ce système que la première évidence de cet effet a été démontrée dans un modèle expérimental animal, en utilisant des rétrovecteurs pour insérer TK *in situ* (Culver *et al.*, 1992). Les gliomes cérébraux de rats avaient complètement régressé après le traitement au GCV. Plusieurs autres études ont confirmé une élimination des tumeurs, même si seulement 10% des cellules étaient TK-positives (Freeman *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994). Cependant, certains auteurs ont rapporté que des tumeurs ayant un volume supérieur à 150 mm³ (modèle animal) ne pouvaient être éliminées complètement par ce traitement (Izquierdo *et al.*, 1997). Une étude plus récente a montré que des tumeurs supérieures à 4000 mm³ (modèle animal) pouvaient être complètement éradiquées, si 100% des cellules tumorales étaient transduites, à la suite d'une injection intra-tumorale de rétrovecteurs contenant TK (Brand *et al.*, 2001).

La première étude clinique (1991) à avoir été approuvée avec GCV/TK était pour traiter le cancer ovarien. C'était une approche thérapeutique justifiable, puisque la maladie est confinée à la cavité péritonéale chez plus de 80% des patientes (Freeman *et al.*, 1999). Aujourd'hui, des études cliniques pour cette indication sont toujours en cours (phase II)

et de nombreuses autres études cliniques se penchent sur les tumeurs au cerveau, en particulier les glioblastomes récurrents (phase II) ou encore les glioblastomes récemment dignostiqués (phase III, incluant un centre du Campus Hospitalier de l'Université de Montréal), car le pronostic est souvent très brutal pour ce type de tumeur (Freeman *et al.*, 1999; Office of Biotechnology Activities/NIH, 2002).

1.4.2 La 5-fluorocytosine et la cytosine déaminase bactérienne

L'enzyme bactérienne cytosine désaminase (CD) de *Escherichia coli*, convertit la 5-fluorocytosine (5-FC) en 5-fluorouracile (5-FU), un antimétabolite couramment utilisé dans la chimiothérapie du cancer (Mullen *et al.*, 1992; Black *et al.*, 2001). La CD catalyse la désamination de la cytosine en uracile et comme les cellules de mammifères n'en produisent pas de grandes quantités, la 5-FC non toxique est bien tolérée par celles-ci (Mullen *et al.*, 1992). Une fois la conversion en 5-FU, on assiste à l'élimination des cellules cancéreuses. Le promédicament, la 5-FC, est utilisée comme antifongique dans le traitement de la candidase (Black *et al.*, 1992; Mullen, 1999). Comme la CD est aussi produite par les fungi, une version améliorée de ce système avec une CD de cette origine a été testée. Le système 5-FC/CD a alors démontré une réponse thérapeutique supérieure dans un modèle *in vivo* de cellules cancéreuses squameuses de la tête et du cou (Hamstra *et al.*, 1999).

Plusieurs auteurs ont comparé les gènes suicides TK et CD. Le gène CD semblerait plus avantageux dans certaines situations et cela à cause de l'effet de voisinage. En voici les raisons proposées par Mullen (1999): 1) l'enzyme CD ne requière aucun co-facteur cellulaire ou intermédiaire pour exécuter la désamination de la 5-FC qui peut prendre place dans l'espace intercellulaire, tandis que TK a besoin d'un donneur phosphate pour

activer le GCV à sa forme monophosphate. La réaction doit donc avoir lieu à l'intérieur des cellules; et 2) La 5-FU est une molécule non chargée qui peut diffuser à travers les membranes cellulaires, tandis que les formes monophosphate, diphosphate et triphosphate du GCV sont chargées et doivent passer nécessairement à travers des jonctions de type *gap* et non pas par simple diffusion. Néanmoins, selon le type de lignée cellulaire testée, TK peut s'avérer plus efficace que CD.

Des études cliniques de phase I sont en cours avec le système 5-FC/CD, pour les métastases hépatiques du carcinome du côlon ou encore, en combinaison avec GCV/TK pour le cancer récurrent de la prostate (Office of Biotechnology Activities/NIH, 2002).

Les progrès thérapeutiques réalisés avec ces différents systèmes de promédicament/gène suicide amènent la possibilité de réaliser une thérapie combinant plusieurs drogues, grâce au transfert simultané de plusieurs gènes. Puisque nous savons que plusieurs types de tumeurs répondent mieux à une combinaison d'agents de chimiothérapie qu'à une monothérapie, cela soulève la possibilité de développer des nouveaux gènes suicides pouvant compléter l'action des paires GCV/TK ou 5-FC/CD déjà existantes.

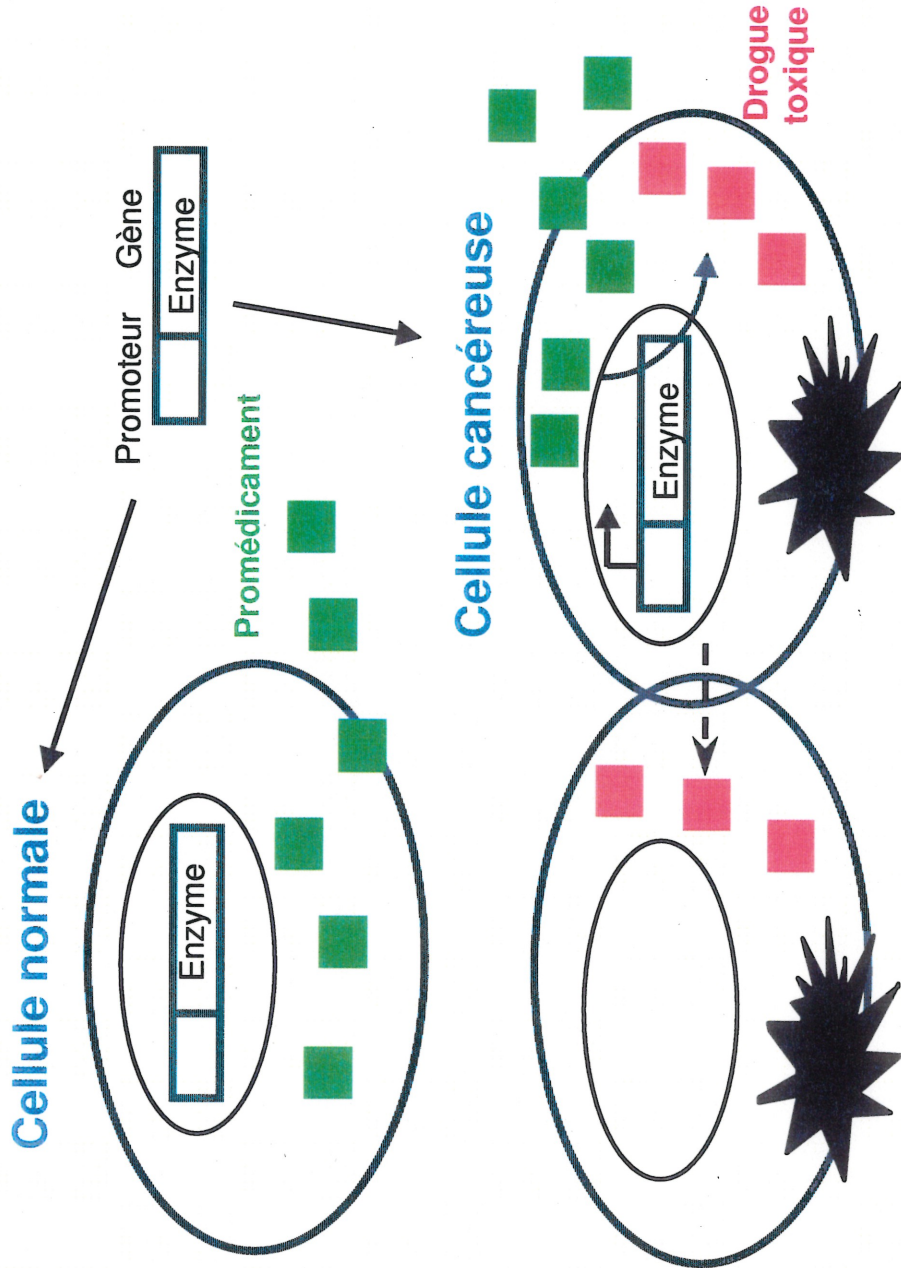


Figure 1.3 Schéma d'un système d'activation d'un promédicament (en vert) en une drogue toxique (rouge). Suite au transfert d'un vecteur contenant un promoteur spécifique de tumeur et un gène suicide, l'activation a lieu uniquement dans la cellule cancéreuse. Le promédicament n'est pas converti dans la cellule normale, puisque le promoteur de tumeur ne permet pas l'expression du gène suicide. Les étoiles (en noir) représentent la mort cellulaire et la flèche (en pointillé) indique l'effet de voisinage.

CHAPITRE 2: Présentation de trois systèmes potentiels de promédicaments activables par des gènes suicides

Ce chapitre consiste à décrire les composantes de trois systèmes potentiels de promédicaments activables par des gènes suicides. Les résultats du premier système présenté, la prodoxorubicine et la pénicilline amidase, feront l'objet du Chapitre 6. Les résultats du second système, l'allopurinol et l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase, feront l'objet du Chapitre 7. Les résultats du clonage de la région 5' du gène adénylosuccinate synthétase pour le dernier système potentiel, seront présentés au Chapitre 8.

2.1 La prodoxorubicine et le gène suicide bactérien pénicilline amidase

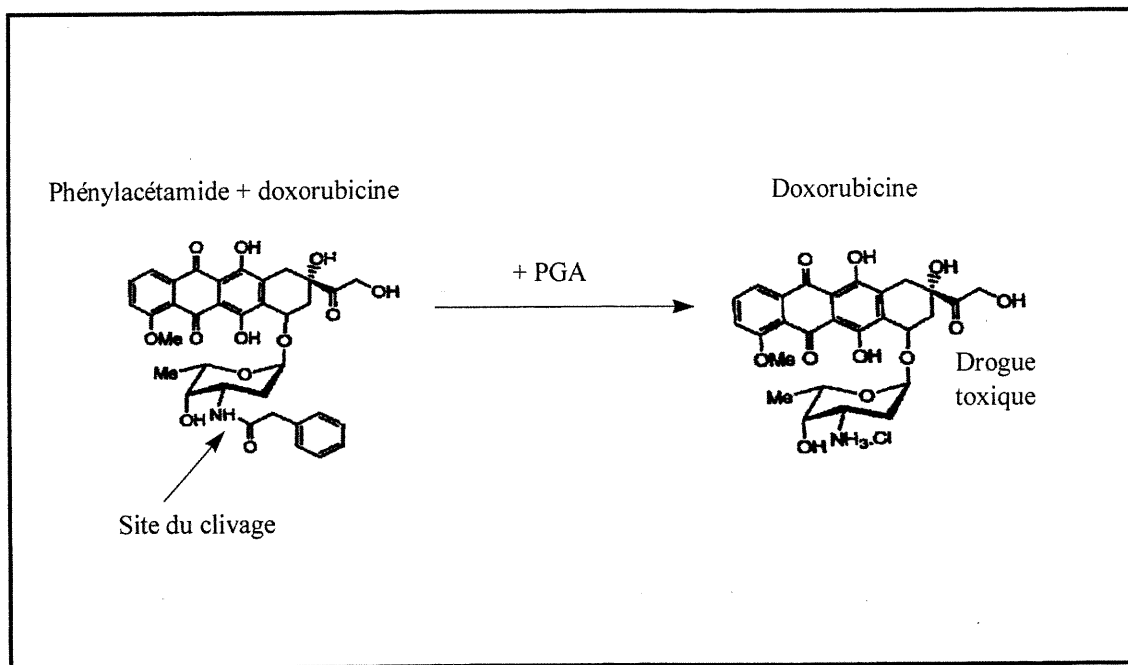
2.1.1 Synthèse de la prodoxorubicine

En collaboration avec une équipe de chimistes du Conseil national de recherches à Ottawa, un promédicament (prodox) constitué de phénylacétamide et de doxorubicine (dox) a été synthétisé. Il est illustré à la Figure 2.1 (p. 29). Le site de clivage par l'enzyme pénicilline amidase (PGA) est indiqué par une flèche. La structure moléculaire de ce promédicament a été confirmée par la technique de spectroscopie de masse (technique *electrospray*), où l'on vérifie la masse moléculaire de la prodox (m.m.: 661.3 g; Figure 2.2A, p. 30), en ayant la dox (chlorhydrate de) comme contrôle (m.m.: 571.3 g; Figure 2.2B, p. 30). La différence de ces masses moléculaires correspond à l'ajout du groupement phénylacétamide.

Pour s'assurer de la stabilité de la prodox, il a été vérifié qu'elle pénètre les cellules cancéreuses par la technique HPLC, ce qui s'est avéré être le cas. Pour réaliser

cette expérience, des cellules cancéreuses incubées avec la prodox sont comparées à un groupe contrôle de cellules, mais incubées avec la dox. Le graphique obtenu dans le cas de la prodox montre un pic unique à 2.547 minutes (Figure 2.3A, p. 31), ce qui n'aurait pas été le cas si la prodox avait été dégradée après avoir diffusé dans les cellules. Dans ce cas, on aurait aussi observé un second pic à 2.620 minutes, comme dans le graphique de la dox, le contrôle (Figure 2.3B, p. 31). Les résultats avec la technique HPLC ont donc confirmé que la prodox diffuse dans les cellules et demeure stable pour une période d'incubation d'au moins 24 heures.

Figure 2.1 Structure moléculaire de la prodox et libération de la dox suite à l'activation par l'enzyme PGA



Après l'activation par l'enzyme PGA dont il sera question à la section 2.1.3, la prodox libère la dox, la drogue cytotoxique, sans aucune autre transformation intermédiaire.

Figure 2.2 Spectres de masse de la prodox (A) et de la dox (B) obtenus par la technique *electrospray*

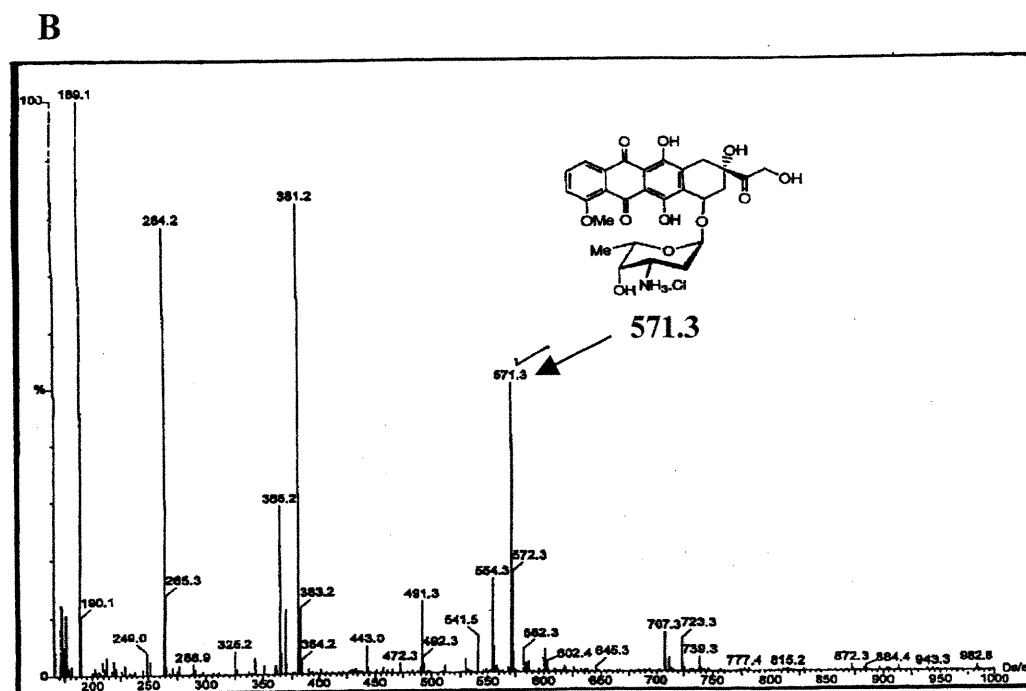
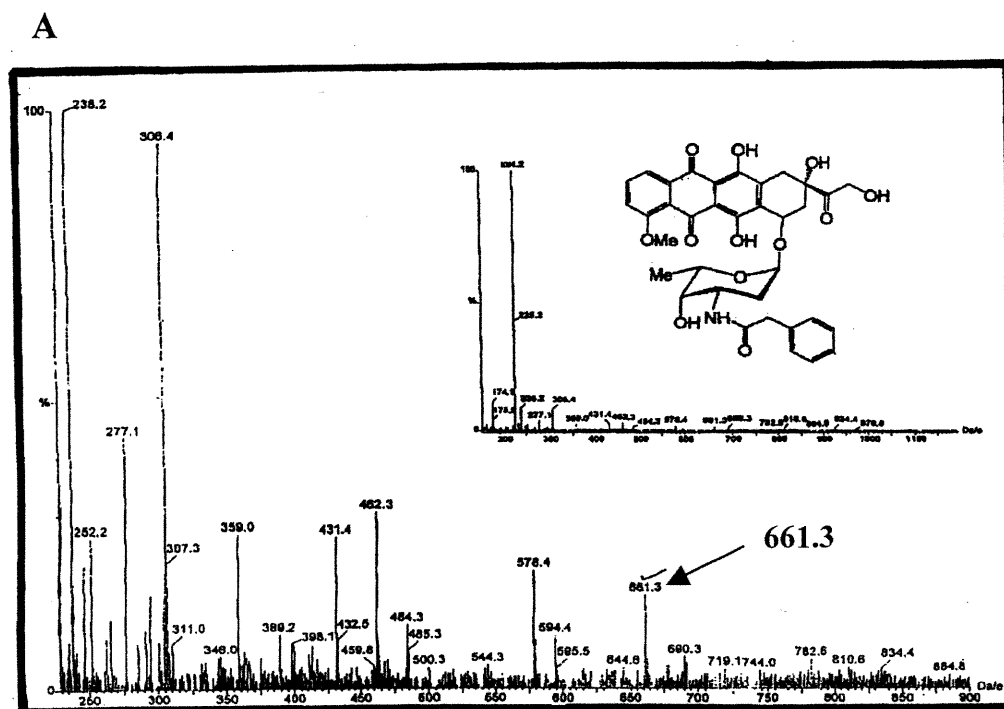
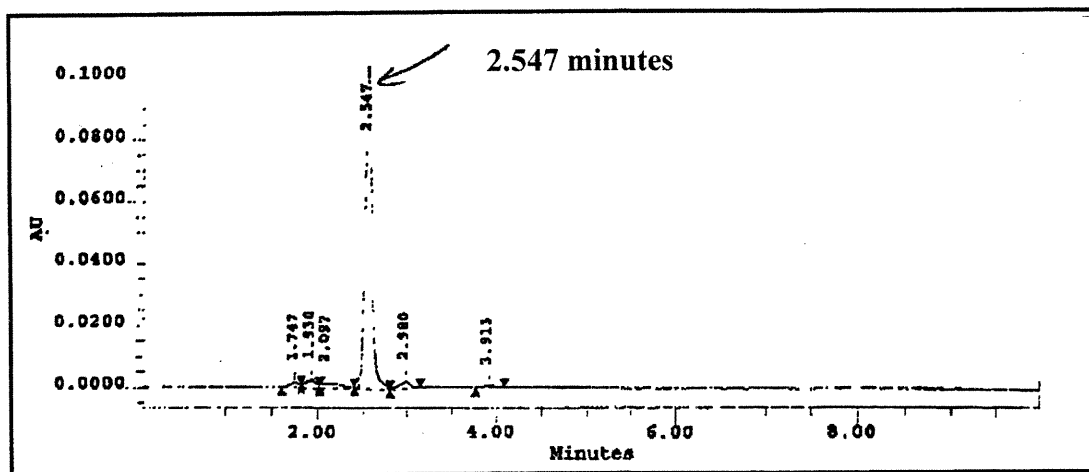
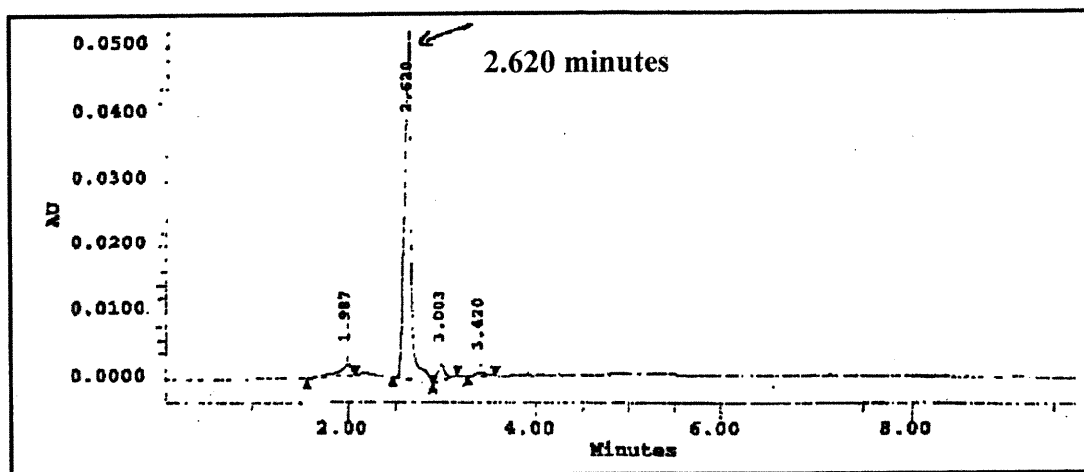


Figure 2.3 Vérification de la pureté de la prodox (A) et de la dox (B) obtenue par la technique HPLC

A



B



2.1.2 La doxorubicine

La dox est un choix idéal puisque c'est une drogue qui est toxique durant tout le cycle cellulaire, contrairement aux antimétabolites (par exemples, la 5-FU ou la 6-MP) qui ne sont actifs qu'à la phase S (division cellulaire). De plus, c'est l'un des agents de chimiothérapie les plus importants en clinique, ayant des indications pour plusieurs types de cancers dont les carcinomes du sein, des ovaires, des testicules, de la thyroïde et du poumon, ainsi que pour le traitement de plusieurs sarcomes des tissus mous et des os et les neuroblastomes. La dox est aussi utile pour certains cancers hématologiques comme la leucémie lymphoblastique ou myéloblastique aiguë et la maladie de Hodgkin (Association pharmaceutique canadienne, 1997a; Salmon et Sartorelli, 1998). Cependant, puisque la dox ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique ou n'atteint pas une concentration importante dans le liquide céphalo-rachidien, il y a une possibilité de métastases au cerveau et aux méninges (American Society of Health-System Pharmacists, 2002a).

C'est au début des années 1960 et 1970, que les agents naturels comme les antibiotiques ont fait leur apparition en chimiothérapie (Nygren, 2001). Les antibiotiques de la classe des anthracyclines comme la dox et la daunorubicine, sont isolés de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (Salmon et Sartorelli, 1998; American Society of Health-System Pharmacists, 2002a). La dox possède une structure semblable à la daunorubicine, mais diffère par un groupement hydroxyacétyl au lieu place d'un groupement acétyle, à la 8^{ème} position (Salmon et Sartorelli, 1998; American Society of Health-System Pharmacists, 2002a). Plusieurs mécanismes d'action expliquent la toxicité des anthracyclines envers les cellules cancéreuses (Salmon et Sartorelli, 1998; Nygren, 2001):

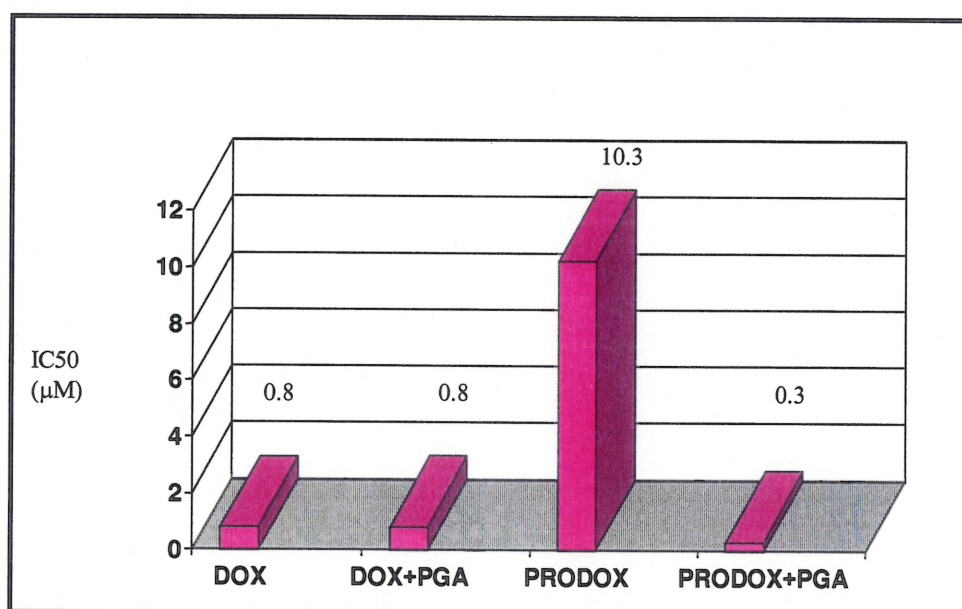
- La capacité de se lier à l'ADN en tant qu'agent intercalant entre les bases azotées, ce qui empêche une réplication normale de l'ADN et de l'ARN et entraîne des bris dans l'ADN (inhibition de la topoisomérase II). Selon Nelson et Kastan (1994), les bris créés dans les brins d'ADN sont capables d'initier un signal p53-dépendant qui met la cellule en d'état d'alerte. Cependant, les drogues comme la dox qui ciblent les topoisomérases, auraient des niveaux d'induction de p53 qui diffèrent selon les cellules, les doses et les expositions de durée variable.
- La liaison par l'extérieur, aux membranes cellulaires, ce qui perturbe le transport normal des ions essentiels au métabolisme cellulaire.
- La génération de radicaux semi-quinones et oxygène. Cette action pourrait être responsable de la toxicité cardiaque causée par cette drogue (dommages membranaires).

En plus de la production intracellulaire excessive de radicaux libres dans le myocarde (cardiotoxicité), la dox cause d'autres effets secondaires dont la myélodépression (Association pharmaceutique canadienne, 1997a; Salmon et Sartorelli, 1998).

Pour valider ce modèle potentiel de prodox activable par la PGA, des résultats préliminaires avaient démontré que le promédicament constitué de dox et de phénylacétamide (prodox) était activé par la PGA chez les cellules MCF7 (cellules humaines de cancer du sein). À l'aide d'un test colorimétrique MTT (bromure de diphényltétrazolium), tel que décrit dans Paterson *et al.* (1998), on observe que la prodox ($IC_{50}=10.3 \mu M$) est 12 fois moins cytotoxique que la dox ($IC_{50}=0.8 \mu M$). L'ajout de la PGA au milieu de culture contenant la prodox augmente la cytotoxicité d'un

facteur de 30 ($IC_{50}=0.3 \mu M$), par rapport à la prodox seule ($IC_{50}=10.3 \mu M$), ce qui montre que le promédicament est activé de façon efficace par la PGA. Aussi, l'ajout de la PGA au milieu contenant la dox ($IC_{50}=0.8 \mu M$) ne montre pas de toxicité additionnelle par rapport à la dox seule ($IC_{50}=0.8 \mu M$). La PGA n'a donc pas d'effet toxique. Ces résultats préliminaires sont présentés dans un histogramme à la Figure 2.4.

Figure 2.4 L'effet cytotoxique de la dox suite à l'activation de la prodox par la PGA chez les cellules MCF7 (test colorimétrique MTT)



Le test colorimétrique MTT permet de distinguer entre les cellules viables et non viables, selon les besoins physiologiques de la mitochondrie active à métaboliser le MTT uniquement dans les cellules viables (Paterson *et al.*, 1998). La valeur de IC_{50} a été calculée comme étant la concentration de drogue causant la mort de 50% du nombre total de cellules, comparativement aux cellules incubées uniquement avec du milieu de culture.

2.1.3 La pénicilline amidase bactérienne

2.1.3.1 Description

L'enzyme bactérienne pénicilline amidase G (PGA; EC3.5.1.11) est d'une importance industrielle considérable, particulièrement dans la production d'acide 6-aminopénicillanique (6-APA), qui est un intermédiaire dans la synthèse des pénicillines semi-synthétiques (Virden, 1990; Valle *et al.*, 1991; Gumpert *et al.*, 1996). Cette enzyme est synthétisée par plusieurs souches de *Escherichia coli*, mais est aussi répandue chez plusieurs espèces de levures, fungi et actinomycètes. Dans cette thèse, c'est le gène pour la pénicilline amidase "G" de *E. coli* qui est utilisé et sa séquence nucléotidique complète a été déterminée (Schumacher *et al.*, 1986; Oh *et al.*, 1987). La protéine PGA est un hétérodimère formé deux sous-unités non identiques α et β provenant d'un seul précurseur polypeptidique. Après maturation, le précurseur de 95 kDa fait place à une enzyme mature contenant une sous-unité α de 24 kDa qui confère la spécificité pour les chaînes latérales de pénicilline et une sous-unité β de 65 kDa, contenant le site catalytique à son extrémité N-terminale (Schumacher *et al.*, 1986; Gumpert *et al.*, 1996).

Selon la littérature, le gène bactérien PGA est un choix judicieux, puisque l'enzyme peut convertir plusieurs substrats, incluant les dérivés phénylacétamides de plusieurs médicaments cytotoxiques dont les anthracyclines et les agents alkylants (Connors, 1995). L'activation intracellulaire de promédicaments par la PGA propose une approche nouvelle, puisque l'expression de la PGA se fera à l'intérieur même des cellules de mammifères, contrairement aux études antérieures qui utilisent des systèmes d'activation extracellulaire. Ces systèmes sont passés en revue dans la section qui suit.

2.1.3.2 Applications antérieures en thérapie génique

Jusqu'à présent, les recherches en thérapie génique ont utilisé cette enzyme avec la technique ADEPT discutée au Chapitre 1. Kerr *et al.* (1990) ont combiné deux anticorps monoclonaux, soit le L6 (anti-carcinome) ou le 1F5 (anti-cellule B-lymphome), à l'enzyme pénicilline amidase V (PAV) qui hydrolyse des dérivés phénoxyacétamides de dox et de melphalan. Les études *in vitro* ont montré que les promédicaments de phénoxyacétamide étaient 80 et 20 fois moins toxiques, respectivement, que les drogues seules, pour deux lignées cellulaires testées, mais que la toxicité était augmentée lorsque les cellules étaient préalablement traitées avec le conjugué anticorps-enzyme. Cette toxicité était donc spécifique à l'antigène, puisque la liaison du conjugué a augmenté la cytotoxicité du promédicament. Cependant, l'enzyme PAV était trop lente pour générer un niveau toxique de melphalan.

Une étude utilisant cette fois la PGA couplée à un anticorps monoclonal L6, a démontré une activation de dérivés phénylacétamides de dox et de melphalan (Vrudhula *et al.*, 1993). Les surfaces cellulaires portant l'antigène L6 ont préalablement été saturées avec le complexe L6-PGA. Ces promédicaments étaient 10 et 20 fois moins cytotoxiques, respectivement, que les drogues libérées, la dox et le melphalan.

Dans une étude de Bignami *et al.* (1992) utilisant aussi un anticorps monoclonal anti-carcinome (L6) avec l'enzyme PGA, un dérivé phénylacétyl de palytoxine relâche la palytoxine, une toxine agissant au niveau extracellulaire. Cette dernière crée des pores dans les membranes cellulaires, un mécanisme d'action différent des agents de chimiothérapie déjà discutés.

Le Chapitre 6 va présenter les résultats sur l'expression de la PGA dans un environnement eucaryotique, soit des cellules de mammifères. La PGA représente un choix idéal pour les raisons suivantes:

- 1) Le repliement post-traductionnel de la molécule est autocatalytique (Brannigan *et al.*, 1995; Gumpert *et al.*, 1996);
- 2) L'enzyme est stable à diverses températures (Gumpert *et al.*, 1996);
- 3) L'activité enzymatique peut être reconstituée dans le cytoplasme, à partir des deux sous-unités matures de la protéine (Burtscher et Schumacher, 1992).

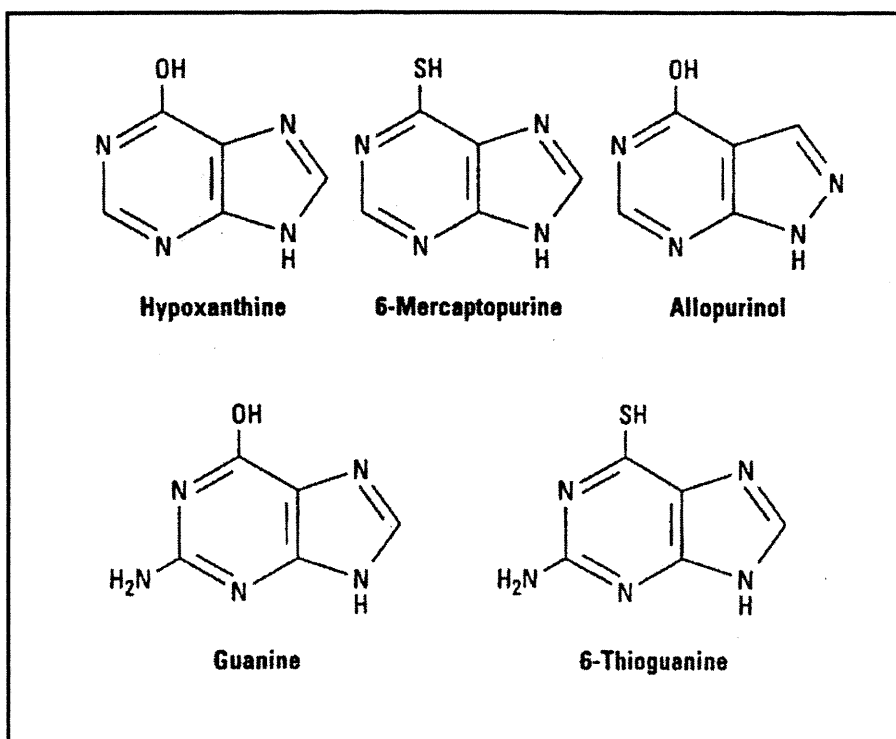
Pour terminer cette section, il faut signaler qu'une recherche approfondie de la littérature a révélé un autre système utilisant un promédicament dérivé de dox, mais activable par un gène suicide différent, la β -glucuronidase humaine (Weyel *et al.*, 2000; Heine *et al.*, 2001). Un glucuroconjugué de dox demeure imperméable aux cellules et est converti par une β -glucuronidase fusionnée à un domaine transmembranaire d'un récepteur. L'activation de ce système est cependant extracellulaire, contrairement au système PGA proposé dans cette thèse.

2.2 L'allopurinol et le gène suicide hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase de parasite

2.2.1 L'allopurinol

L'allopurinol est un isomère structural de l'hypoxanthine, la forme physiologique de la guanine (Figure 2.5, p. 38). Après la seconde guerre mondiale, Georges Hitchings et ses collaborateurs du *Wellcome Research Laboratories*, ont commencé une étude systématique de tous les composés de type purine ou pyrimidine qui pouvaient

Figure 2.5 Structures moléculaires de l'hypoxanthine, la 6-mercaptapurine, l'allopurinol, la guanine et la 6-thioguanine



(Cette image est reproduite avec la permission de The McGraw-Hill Companies, de Salmon, S.E., and Sartorelli, A.C. Cancer Chemotherapy. In *Basic and Clinical Pharmacology*. 8th ed. B.G. Katzung, ed. © 2001, published by the Lange Medical Books/The McGraw-Hill Companies Inc., New York, NY)

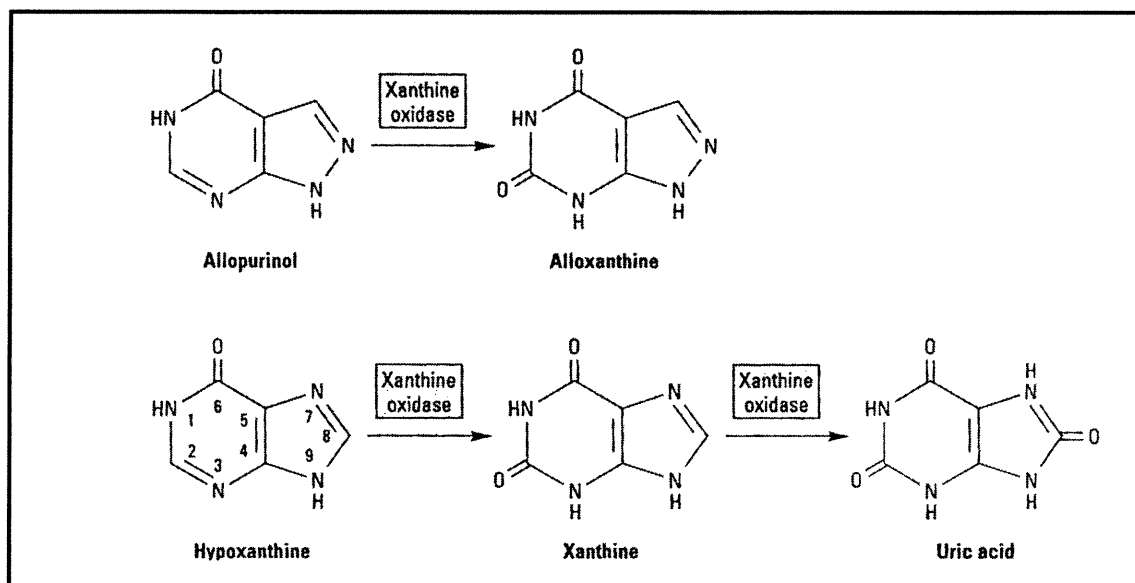
supprimer la croissance néoplasique. C'est ainsi que deux thiopurines toujours utilisées en chimiothérapie, la thioguanine (6-TG) et la mercaptopurine (6-MP) (Figure 2.5, ci-haut), ont vu le jour (Rundles, 1985). Au début des années 1950, la même équipe de chercheurs a étudié plus de cinquante dérivés puriques, pour leur capacité à être des substrats de la xanthine oxidase (XO). Parmi ces composés, se trouvait la 4-hydroxy-(3,4-*d*) pyrazolopyrimidine ou allopurinol (HPP), qui n'était pas seulement un inhibiteur mais aussi un substrat pour l'enzyme XO. L'efficacité de cette nouvelle molécule a d'abord été testée avec l'administration simultanée de 6-MP. Il a alors été rapidement

constaté que cette combinaison pouvait diminuer la formation d'acide urique et qu'une réduction de la dose de 6-MP donnait le même effet thérapeutique. Cette combinaison est donc efficace pour prévenir l'hyperuricémie chez les patients traités en chimiothérapie (Rundles, 1985).

Cette observation s'explique par le mécanisme suivant: la 6-MP est convertie en un métabolite inactif par une réaction d'oxydation catalysée par la XO. En même temps, l'HPP est un inhibiteur de la XO. Pour cette raison, la dose de 6-MP doit être réduite de 25-30% pour éviter une toxicité accrue (Salmon et Sartorelli, 1998; American Society of Health-System Pharmacists, 2002b). Une administration concomitante d'HPP et de 6-MP *per os* peut provoquer une hausse de 500% de la concentration plasmatique de 6-MP (Zimm *et al.*, 1983).

Le mécanisme d'action de l'HPP explique tout naturellement ses indications pour traiter la goutte primaire, la formation récurrente de calculs rénaux, la néphropathie uratique aiguë, l'insuffisance rénale et les affections où il y a une hyperuricémie ou une hyperuricosurie, ou les deux à la fois (Rundles, 1985; Association pharmaceutique canadienne, 1997b; Katzung et Furst, 1998; American Society of Health-System Pharmacists, 2002b). L'HPP inhibe la XO, cette enzyme catalysant la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, et de la xanthine en acide urique (Figure 2.6, p. 40). L'oxypurinol, un métabolite de l'HPP, contribue aussi à inhiber la XO. La conversion d'hypoxanthine et de xanthine en acide urique est bloquée, ce qui a pour conséquence de diminuer les concentrations urinaire et sérique d'acide urique (Thomas *et al.*, 1982; Murrell et Rapeport, 1986; Association pharmaceutique canadienne, 1997b; Katzung et Furst, 1998; American Society of Health-System Pharmacists, 2002b).

Figure 2.6 Le rôle de l'HPP dans l'inhibition de la XO



(Cette image est reproduite avec la permission de The McGraw-Hill Companies, de Furst, D.E., and Munster T. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; disease-modifying antirheumatic drugs; nonopioid analgesics; and drugs used in gout. In *Basic and Clinical Pharmacology*. 8th ed. B.G. Katzung, ed. © 2001, published by the Lange Medical Books/The McGraw-Hill Companies Inc., New York, NY)

Il existe des effets secondaires connus de l'HPP, notamment l'intolérance gastro-intestinale (Katzung et Furst, 1998; American Society of Health-System Pharmacists, 2002b). C'est une substance généralement bien tolérée et plusieurs auteurs n'ont jamais rapporté de cas de surdosage massif (Kann *et al.*, 1968; Brown *et al.*, 1970; Murrell et Rapeport, 1986; Graham *et al.*, 1996; Medical Economics, 2001).

Il a été rapporté qu'une administration d'HPP pouvait même atténuer la myélosuppression produite par la 5-FU (Woolley *et al.*, 1985). Ce phénomène, basé sur des observations faites dans des cellules leucémiques, s'explique par le mécanisme suivant proposé par Schwartz et Handschumacher (1979). L'HPP diminue

l'incorporation de la 5-FU en des nucléotides de type fluoropyrimidine (i.e. des nucléotides analogues de l'uracile), en interférant avec la conversion de la 5-FU en 5-fluorouridine 5'-phosphate. La 5-FU peut être convertie en des nucléotides par l'action séquentielle de l'uridine phosphorylase et de l'uridine kinase, mais elle peut aussi être convertie directement par l'orotate phosphoribosyltransférase. Dans certaines lignées cellulaires, cette transférase a une affinité plus grande pour intégrer l'orotate que la 5-FU. Il y a donc une compétition qui s'établit entre l'orotate et la 5-FU pour l'intégration dans la forme nucléotidique. Aussi, les cellules ont un plus grand pool d'orotate qui devient disponible pour cette réaction, à cause de l'HPP qui favorise justement une accumulation intracellulaire d'orotate (Fox *et al.*, 1970; Beardmore et Kelley, 1974). D'autres auteurs ajoutent que l'HPP et l'oxypurinol, un métabolite de l'HPP transformé par la XO, sont des inhibiteurs de l'orotate décarboxylase et cela contribuerait à l'accumulation subséquente d'orotidine monophosphate et l'élévation d'acide orotique pour compétitionner avec la conversion de la 5-FU par l'orotate phosphoribosyltransférase (Fox *et al.*, 1981).

Un autre effet lié au mécanisme d'action de l'HPP, est la diminution de la biosynthèse *de novo* des purines. Cependant, l'HPP n'affecte pas directement la synthèse des nucléotides puriques et des acides nucléiques. Suite à l'administration d'HPP, une baisse rapide de la concentration de phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) a été observée. Ce substrat est également utilisé dans la voie de récupération des purines (Figure 8.1, p. 137). Il y a donc une boucle de rétroaction négative de la synthèse *de novo* des purines, inhibant l'enzyme transférase utilisant aussi le PRPP comme substrat, mais qui a conséquemment

une activité restreinte face à la disponibilité réduite de ce substrat (Thomas *et al.*, 1982; Rundles, 1985; Murrell et Rapeport, 1986; American Society of Health-System Pharmacists, 2002b).

Il a aussi été découvert que l'HPP, cette drogue aux multiples usages, possède une action antiparasitaire sélective envers les trypanosomes et les leishmanies, sans toutefois affecter l'hôte (Martinez et Marr, 1992; Wang, 1998). La trypanosomiase est une maladie grave contractée par une piqûre d'insecte (mouche tsé-tsé) vivant en Afrique (Center for Disease Control and Prevention, 1999). Ce mécanisme sélectif est catalysé par une enzyme indispensable à la synthèse purique *de novo* du parasite, faisant l'objet de la prochaine section.

2.2.2 L'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase de parasite

2.2.2.1 Description

Le gène hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase du parasite *Trypanosoma brucei* (TbHGPR) a été isolé et cloné, produisant une enzyme de 23.4 kDa (Allen et Ullman, 1993). Contrairement à son homologue humain qui a peu d'affinité pour l'HPP, ce substrat est converti par TbHGPR en des nucléotides correspondants qui seront subséquentement métabolisés en triphosphates et incorporés dans l'ARN du parasite (Fish *et al.*, 1985; Azas *et al.*, 1997). En effet, il a été démontré que l'enzyme HGPR humaine catalyse la phosphoribosylation de l'HPP à seulement 10% de l'efficacité de *Leishmania donovani*, un autre membre de la famille *Trypanosomatidae* (Tuttle et Krenitsky, 1980). S'inspirant de cette réaction sélective amenant la mort du

trypanosome, j'ai décidé de tester le système HPP/TbHGPRT pour éliminer les cellules cancéreuses. Les résultats de cet objectif expérimental sont présentés au Chapitre 7.

Le rôle de l'enzyme HGPRT à catalyser l'intégration du PRPP et de l'hypoxanthine dans la voie de récupération des purines chez l'humain, est illustré à la Figure 8.1 (p. 137). La production de nucléotides à base d'HPP chez le trypanosome y est illustrée en parallèle.

2.2.2.2 Applications antérieures en thérapie génique

Jusqu'à présent, TbHGPRT représente le premier gène suicide provenant d'un parasite pour la thérapie génique du cancer. Une approche approfondie de la littérature a révélé l'existence d'une technique innovatrice utilisant aussi des protozoaires, mais en tant que vecteurs (Vaccaro, 2000). Ces derniers, appartenant à la même famille que les trypanosomes, peuvent naturellement cibler les lysosomes et y faire produire des protéines déficientes dans le cas de maladies génétiques (*lysosomal storage disease*), par l'introduction de gènes codant pour les protéines naturelles.

Des études antérieures ont utilisé des enzymes impliquées dans les mêmes voies métaboliques: ceci est le cas du gène suicide *gpt* de *E. coli*, mais il active un promédicament différent de l'HPP (Mroz et Moolten, 1993; Ono *et al.*, 1997). Le gène en question produit l'enzyme xanthine-guanine phosphoribosyltransférase (XGPRT; *gpt*) qui a une fonction identique à HGPRT, c'est-à-dire catalyser l'incorporation de l'hypoxanthine ou de la guanine dans la voie de récupération des nucléotides puriques. Le gène suicide *gpt* de *E. coli* est capable d'activer la 6-thioxanthine chez des cellules

préalablement sélectionnées avec de l'acide mycophénolique, selon leur déficience en HGPRT.

D'autres chercheurs ont exploité une enzyme impliquée dans une voie métabolique semblable, celle de la récupération des bases pyrimidiques. C'est le cas de l'uracil phosphoribosyltransférase (UPRT) de *E. coli* qui active la 5-FC (Koyama *et al.*, 2000).

2.3 L'allopurinol, l'allopurinol riboside et le gène suicide adénylosuccinate synthétase de parasite

Le gène adénylosuccinate synthétase de Tb (TbASS) possède aussi une affinité sélective pour l'HPP, contrairement à son homologue humain (Spector *et al.*, 1982, 1984). Un des dérivés de l'HPP, l'HPP riboside, est une drogue expérimentale efficace *in vitro* et chez les animaux infectés par le parasite *Leishmania* appartenant à la même famille que Tb (Shapiro *et al.*, 1991). L'action antiparasitaire de l'HPP riboside conduit, tout comme l'HPP, à la formation d'analogues de l'adénosine triphosphate qui sont incorporés dans l'ARN du parasite (Marr *et al.*, 1978; Nelson *et al.*, 1979).

Le gène ASS a été cloné et caractérisé chez plusieurs espèces, mais jamais chez le parasite Tb. Les résultats du clonage de la région 5' sont décrits pour la première fois au Chapitre 8. L'enzyme ASS joue un rôle clé dans la synthèse de l'adénosine monophosphate (AMP) et de la guanosine monophosphate (GMP), des réactions réalisées via l'inosine monophosphate (IMP) (voir la Figure 8.1, p. 137). L'implication de l'ASS dans ces voies biochimiques explique son application potentielle en tant que gène suicide.

CHAPITRE 3: Principaux vecteurs utilisés en thérapie génique

La cytotoxicité générée par les systèmes de promédicaments activables par les gènes suicides n'est possible que si ceux-ci sont transférés de façon efficace dans les cellules tumorales. Le choix d'un vecteur est donc crucial. L'administration systémique de la génération actuelle de vecteurs viraux n'est pas vraiment faisable et l'application des gènes suicides est généralement restreinte à des tumeurs isolées comme les tumeurs intracérébrales, le cancer de la prostate ou des tumeurs entourées de cellules quiescentes (Knox, 2001). Ceci explique en partie la raison pour laquelle la voie intra-tumorale est la plus utilisée (24.7%) dans les protocoles cliniques actuels de thérapie génique (The Journal of Gene Medicine, 2001).

Les caractéristiques souhaitables d'un vecteur idéal sont les suivantes:

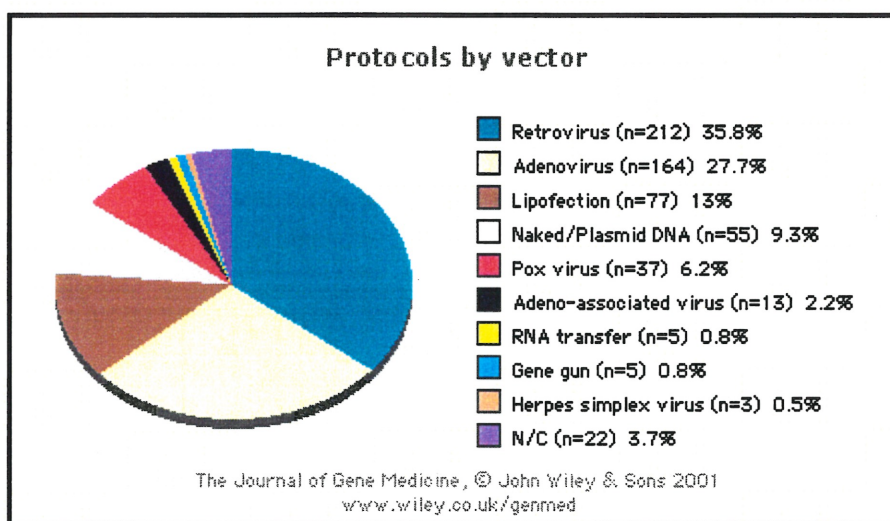
- Ne pas produire de réponse immunitaire et être non toxique;
- Une efficacité de transfert du matériel génétique *ex vivo* et *in vivo*;
- L'intégration du transgène doit se faire à un site spécifique du génome de l'hôte;
- L'expression du transgène doit être stable et contrôlable de façon à atteindre les effets thérapeutiques voulus;
- La spécificité à un type de tissu ou de tumeur;
- Être facile à produire et en grandes quantités.

Présentement, aucun vecteur ne possède toutes les caractéristiques énumérées ci-haut.

Les vecteurs sont classifiés en vecteurs non viraux ou viraux et leur répartition dans les

protocoles cliniques est illustrée à la Figure 3.1 (p. 46). Vu l'importance des vecteurs en thérapie génique, ce chapitre vise à décrire brièvement les principaux de types de vecteurs. La fin de ce chapitre est consacrée au fonctionnement des rétrovirus qui ont été utilisés comme vecteurs pour deux systèmes de gènes suicides proposés dans cette thèse dont les résultats sont présentés aux Chapitres 6 et 7.

Figure 3.1 Répartition des protocoles de thérapie génique par type de vecteur



(Cette image est reproduite avec la permission de John Wiley & Sons, The Journal of Gene Medicine, site web <http://www.wiley.co.uk/genmed>.)

3.1 Les vecteurs non viraux

Ces techniques comprennent l'administration directe d'ADN plasmidique enroulé en super-hélice (*naked DNA*) dans les tissus (microinjections), ainsi que les approches physiques (*gene gun* et électroporation) ou chimiques (lipides cationiques/liposomes ou polymères), qui ont été utilisées pour améliorer la spécificité cellulaire des transferts faits avec de l'ADN plasmidique aussi (Cooper, 1999; Beltinger *et al.*, 2001; Nishikawa et Huang, 2001; Schatzlein, 2001).

La plus simple des ces techniques, le transfert d'ADN plasmidique, a atteint un niveau significatif d'expression du transgène dans le muscle squelettique et cardiaque, ainsi que le cerveau, le foie et la thyroïde (Cooper, 1999; Nishikawa et Huang, 2001; Schatzlein, 2001), quoiqu'il n'y ait pas d'intégration chromosomique. Pour administrer l'ADN plasmidique de façon systémique, il faut l'enrober de lipides cationiques (liposomes ou polymères), afin d'éviter la dégradation *in vivo* (Nishikawa et Huang, 2001; Schatzlein, 2001).

Une alternative pour le transfert d'ADN plasmidique *in vivo* dans les cellules, est d'utiliser des particules métalliques dont l'or, enduites d'ADN. Ces dernières sont ensuite accélérées avec une grande vitesse (*gene gun*) et introduites dans des tissus chirurgicalement exposés (Cooper, 1999; Nishikawa et Huang, 2001). L'électroporation, l'application de courants électriques intenses pour perméabiliser les membranes de façon réversible, est une autre technique pour introduire de l'ADN plasmidique dans certains tissus comme la peau et les mélanomes (Nishikawa et Huang, 2001).

L'addition de lipides cationiques à l'ADN plasmidique permet de diminuer sa charge négative et de faciliter son interaction avec les membranes cellulaires. Les structures liposomales vont alors fusionner avec les membranes et permettre le transfert génétique. La membrane des vésicules cationiques possède une charge positive et l'interaction avec la charge négative de l'ADN amène l'agrégation des liposomes (Schatzlein, 2001). Les complexes d'ADN liposomiques sont administrés par la voie intraveineuse et apportent l'ADN plasmidique à de nombreux tissus et tumeurs par la microvascularisation sanguine (Cooper, 1999; Nishikawa et Huang, 2001). Des lipides neutres comme le

cholestérol sont utilisés pour faciliter la libération d'ADN du complexe, après l'endocytose (Nishikawa et Huang, 2001). Les polymères cationiques de poids moléculaire élevé comme la poly-L-lysine (PLL) et la polyéthylène imine (PEI), se sont montrés plus efficaces pour condenser l'ADN. La PEI a été utilisée *in vivo* pour le transfert de gènes dans le cerveau, le rein et le poumon, par les voies intratrachéale et intraveineuse (Nishikawa et Huang, 2001; Schatzlein, 2001).

Par rapport aux vecteurs viraux, les vecteurs non viraux présentent des avantages dont la simplicité d'utilisation, la production à grande échelle et l'absence d'une réponse immunitaire spécifique (Beltinger *et al.*, 2001; Schatzlein, 2001). De plus, les liposomes ne risquent pas de provoquer de mutagenèse, car ils ne s'intègrent pas dans le génome de la cellule hôte (Beltinger *et al.*, 2001). Ils peuvent contenir une quantité quasiment illimitée de matériel génétique (Crystal, 1995). Ces vecteurs non viraux ont cependant des faiblesses que les vecteurs viraux peuvent combler dont la faible expression du matériel génétique transféré. Cependant, toutes les barrières au transport *in vivo* des liposomes, telles que l'agrégation aux protéines sériques et aux cellules sanguines, devraient être résolues avec le progrès de cette technologie. On utilise déjà en clinique des formes de liposomes pour encapsuler des agents de chimiothérapie dont la dox (Harris *et al.*, 2002). Les liposomes sont en effet recouverts de méthoxypolyéthylèneglycol (MPEG), empêchant le système phagocytaire de les détecter et cela prolonge leur demi-vie (Association des pharmaciens du Canada, 2000). Un désavantage majeur des liposomes est leur manque de spécificité pour atteindre les cellules ciblées, quoique ce problème puisse être résolu par l'addition de ligands

reconnaissant des récepteurs ou des antigènes spécifiques aux tumeurs (Crystal, 1985; Roth et Cristiano, 1997).

3.2 Les vecteurs viraux

Ces vecteurs dont quelques-uns sont décrits dans les paragraphes suivants, ont été développés à partir de virus de façon à exploiter leur capacité naturelle à infecter les cellules humaines et à transférer leur matériel génétique.

3.2.1 Les parvovirus

Les parvovirus sont caractérisés par leur petitesse et un ADN à simple brin. Les parvovecteurs peuvent accepter une séquence codante d'au plus 4,6 kb (Roth et Cristiano, 1997; Simons *et al.*, 1999).

Les plus connus des parvovirus en tant que vecteurs, sont les virus adéno-associés (AAV) qui doivent être cotransduits avec un virus assistant (*helper*), soit un adénovirus ou un virus de type herpès, afin d'obtenir une infection efficace. En l'absence de ce vecteur assistant, l'AAV s'intègre dans le chromosome de l'hôte (Wong *et al.*, 1999). Pour les AAV ayant un phénotype sauvage, la capacité d'intégration se ferait à un endroit spécifique dans le chromosome 19 de l'hôte. Cette activité n'a cependant pas été observée chez les vecteurs construits à partir d'AAV (Mulligan, 1993; Roth et Cristiano, 1997).

Ces vecteurs présentent le désavantage d'être difficiles à purifier à cause de la présence du virus assistant. Leur expression est stable, mais ne serait pas aussi efficace que les rétrovirus. D'un autre côté, ils ont l'avantage d'être non pathogéniques et de pouvoir

transduire une panoplie de cellules, incluant des cellules quiescentes (Mulligan, 1993; Wong *et al.*, 1999). Plusieurs travaux ont montré du potentiel pour les vecteurs AAV: une expression de 12 à 18 mois, dans le muscle squelettique de souris, a été rapportée (Xiao *et al.*, 1996).

3.2.2 Les virus vaccinia

Les vecteurs construits à partir des virus vaccinia présentent une particularité intéressante. Les membres de cette famille, les *poxviridae*, possèdent une réplication et une transcription de leur génome qui se fait dans le cytosol des cellules infectées, à l'aide de polymérase virales. La recombinaison de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte (comme avec les rétrovecteurs) ne représente donc pas un risque potentiel (Lattime *et al.*, 1999). Les virus vaccinia sont connus pour leur expression transitoire, leur capacité à contenir de grands fragments d'ADN (jusqu'à 25 kb) et à pénétrer une grande variété de cellules, tout en étant applicables à plusieurs modèles animaux (Roth et Cristiano, 1997; Lattime *et al.*, 1999; Beltinger *et al.*, 2001).

Ces vecteurs ont démontré leur efficacité et leur innocuité dans des modèles précliniques. Des études sont prévues pour introduire *in situ* des cytokines chez des patients souffrant d'un mélanome ou d'un cancer de la vessie (Lattime *et al.*, 1999). L'application *in situ* de ces vecteurs a aussi fait ses preuves avec un gène suicide, dans un modèle de métastase hépatique (Puhlmann *et al.*, 1999).

3.2.3 Les adénovirus

Les adénovirus, ces virus contenant un ADN à double brins, ont sûrement été parmi les vecteurs de première génération en thérapie génique et ils sont encore d'usage répandu dans les études *in vivo* et cliniques. Les vecteurs adénoviraux pénètrent les cellules par deux récepteurs: celui spécifique aux adénovirus, le *coxsackie/adenovirus receptor* (CAR) et les intégrines de surface α_v (Crystal, 1995; Beltinger *et al.*, 2001). Ils sont pratiques pour les applications *in vivo*, car ils peuvent être produits à des titres élevés (jusqu'à 10^{13} particules/ml) et s'expriment dans une panoplie de cellules, incluant des cellules quiescentes ou en division (Mulligan, 1993; Crystal, 1995; Meng et El-Deiry, 1999; Frederiksen *et al.*, 1999).

Les vecteurs dérivés des adénovirus peuvent accepter jusqu'à 30 kb de matériel génétique (Simons *et al.*, 1999), mais l'ADN adénoviral demeure épisomique dans le noyau de la cellule hôte, ce qui donne une expression transitoire du gène d'intérêt inséré dans ces vecteurs. L'expression stable d'un gène est plus avantageuse lorsqu'on recherche une réponse thérapeutique complète, comme dans le cas des gènes suicides. Une expression transitoire est suffisante dans les protocoles introduisant le gène p53, car l'effet désiré est habituellement accompli en quelques jours, d'où l'utilité des adénovirus (Frederiksen *et al.*, 1999). Cependant, le plus grand désavantage de ces vecteurs est la réponse immunitaire de l'hôte (Mulligan, 1993; Crystal, 1995; Roth et Cristiano, 1997; Meng et El-Deiry, 1999).

3.2.4 Les lentivirus

Les lentivecteurs, la toute dernière génération de vecteurs dérivés des lentivirus, dont celui de l'immunodéficience humaine de type 1 ou 2 (HIV-1, HIV-2), sont en réalité des rétrovirus complexes. Les séquences responsables de leur virulence ont été enlevées pour construire un vecteur et l'intérêt vient de leur capacité à intégrer des cellules quiescentes (Baum *et al.*, 1999; Meng et El-Deiry, 1999; Lai et Brady, 2002).

Jusqu'à présent, les lentivecteurs n'ont pas été introduits dans les études cliniques, mais ils ont prouvé leur efficacité à transduire de façon stable des lignées cellulaires quiescentes du système nerveux central (Lai et Brady, 20002), ainsi que des cellules d'origine hématopoïétique telles que les érythrocytes, granulocytes, lymphocytes, monocytes et mégacaryocytes, ce qui s'avère prometteur pour les affections lymphohématologiques (Baum *et al.*, 1999; Salmon *et al.*, 2000; Salmon *et al.*, 2001).

3.3 Les rétrovirus

L'usage des vecteurs rétroviraux domine la recherche en thérapie génique depuis quelques années. Ils représentent la classe de vecteurs les plus utilisés pour les applications *in vivo* (Byun *et al.*, 1996; Roth et Cristiano, 1997; Baum *et al.*, 1999). Si on se réfère aux statistiques du Journal of Gene Medicine (2001), 35.8% des protocoles cliniques font l'usage de rétrovecteurs (Figure 3.1, p. 46).

La principale caractéristique des rétrovirus est leur capacité à s'intégrer dans le génome des cellules en division et ainsi d'exprimer les gènes qu'ils transfèrent comme s'ils étaient les propres gènes de la cellule hôte. Ils expriment alors les gènes thérapeutiques de façon

stable, ce qui en fait des vecteurs de choix pour les systèmes de gènes suicides (Baum *et al.*, 1999). Cette intégration préférentielle dans les cellules en division offre un mécanisme unique pour la destruction des cellules tumorales constituant les gliomes (avec le système GCV/TK présenté à la section 1.4.1), tout en laissant intactes les cellules adjacentes du cerveau (Ram *et al.*, 1993; Ram *et al.*, 1997).

La majorité des rétrovecteurs utilisés en thérapie génique proviennent des *murine leukemia virus* (MLV) dont la souche *Moloney* (Byun *et al.*, 1996; Baum *et al.*, 1999). Ils appartiennent aux rétrovirus mammaliens de type C et ils sont classifiés selon les espèces auxquelles leur récepteur peut adhérer: écotropes pour les cellules de rongeurs; xénotropes pour toutes les cellules sauf celles de souris; polytropes et amphotropes pour les cellules de souris et non de souris, respectivement (Baum *et al.*, 1999).

3.3.1 Le cycle de vie

Le génome des rétrovirus contient trois séquences fournissant l'information essentielle à la production des protéines structurales d'un virion (Lewin, 1997; Baum *et al.*, 1999):

- 1) *Gag*, produisant la matrice virale qui couvre l'ARN génomique rétroviral dans une nucléocapside;
- 2) *Pol*, fournissant les enzymes nécessaires à la réplication dont la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase. Une caractéristique importante des rétrovirus MLV est que la RT peut synthétiser un brin d'ADN à partir d'un brin d'ARN. Elle peut aussi utiliser comme matrice de l'ADN simple brin (Matton, 1997).
- 3) *Env*, produisant le récepteur de surface ancré dans l'enveloppe virale grâce à une protéine transmembranaire.

Ces séquences *gag*, *pol* et *env*, sont elles-mêmes flanquées de séquences *long terminal repeat* (LTR) contenant les éléments jouant un rôle dans la transcription inverse (LTR 5' et LTR 3'), ainsi que dans l'initiation de la transcription (LTR 5' uniquement).

Les rétrovirus adhèrent d'abord à un récepteur de la surface cellulaire grâce à une protéine encodée par *env*, puis il y a une fusion des membranes cellulaires et virales. L'ARN génomique viral est relâché de sa capsid dans le cytoplasme et il est transcrit en un ADN proviral par la RT virale. Il y a alors un transport du provirus (ADN double brins nouvellement synthétisé) vers le compartiment nucléaire de la cellule hôte et son intégration génomique s'effectue. Subséquemment, il y a transcription de l'ARNm génomique (et subgénomique), puis traduction des protéines virales pour l'assemblage des nouveaux virions qui vont bourgeonner des cellules hôtes infectées.

Le complexe proviral étant incapable de diffuser à travers les pores nucléaires, contrairement aux lentivirus, il doit y avoir une mitose afin de permettre l'estompement de la membrane nucléaire (Baum *et al.*, 1999). L'intégration chromosomique du provirus est aléatoire, quoiqu'il semble y avoir une préférence pour la chromatine peu condensée (Rohdewohld *et al.*, 1987).

3.3.2 Le fonctionnement des rétrovecteurs

Le fonctionnement des rétrovecteurs peut légèrement varier selon leur architecture, mais en général, ils sont construits de façon à reproduire l'expression stable des gènes qu'ils transfèrent. Pour des raisons d'efficacité et de sécurité, ils sont incapables d'assurer leur propre réplication et des cellules d'encapsulation (*packaging cells*) doivent être utilisées

(Ory *et al.*, 1996). Ces dernières fournissent de façon stable les séquences virales *gag*, *pol* et *env*, dont les rôles ont été discutés au paragraphe précédent.

Dans ces cellules d'encapsidation, les séquences *gag*, *pol* et *env*, sont physiquement distinctes du vecteur (Figure 3.2, p. 58). Puisqu'elles sont retirées de ce dernier, on retrouve dans son architecture un promoteur viral LTR et un signal d'encapsidation dont le rôle est de guider les ARN prêts à être assemblés lors de la production de rétroparticules (Baum *et al.*, 1999). Tel que schématisé à la Figure 3.2 (p. 58), c'est l'ARN du gène suicide qui sera encapsidé pour créer un nouveau virus (ou rétroparticule), incapable de s'auto-répliquer après la transduction des cellules cibles. Les cellules d'encapsidation sont donc transfectées de façon transitoire ou stable avec le rétrovecteur, puis le surnageant est récupéré, filtré et concentré, pour ne conserver que les virus produits, afin de procéder à une éventuelle transduction dans des cellules cibles (Galipeau *et al.*, 1999).

Pour la production de rétroparticules contenant les gènes suicides présentés aux Chapitres 6 et 7, c'est un rétrovecteur bicistronique (i.e. produisant deux protéines à partir d'un seul ARNm) qui a été utilisé. Une séquence *internal ribosomal entry site* (IRES) sépare le gène suicide du gène rapporteur *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) (voir la Figure 3.2, p. 58). L'IRES permet le réassemblage des ribosomes après la traduction du gène suicide situé en amont, de manière à réinitier la traduction de la séquence EGFP située en aval. L'avantage de l'IRES est de produire deux protéines distinctes et non modifiées, à partir d'un seul ARNm bicistronique (Baum *et al.*, 1999). Cette séquence IRES a été décrite pour la première fois chez les *picornavirus* et elle

effectue l'initiation de la traduction indépendamment de la coiffe en 5' (Adam *et al.*, 1991).

Plusieurs vecteurs utilisent une fusion d'un gène rapporteur avec un gène suicide, mais une telle construction peut amener une dégradation ou une dysfonction de la protéine d'intérêt. L'avantage de la séquence IRES est d'obtenir deux protéines authentiques, non modifiées, afin de faciliter leur étude. L'IRES a cependant le désavantage de produire la seconde protéine en quantité moindre, contrairement aux fusions qui assurent une quantité équimolaire des protéines exprimées (Slack *et al.*, 1999).

3.3.3 Les avantages et les désavantages des rétrovecteurs

Les avantages se résument par les points suivants:

- L'intégration stable dans le génome de la cellule cancéreuse et l'expression à long terme du gène suicide. Leur intégration n'affecte habituellement pas le métabolisme des cellules hôtes (Baum *et al.*, 1999). De toute évidence, en thérapie génique suicide, cela est moins important car c'est la destruction des cellules cancéreuses qui est visée sans laisser de traces;
- La capacité d'intégrer des segments d'ADN de 8 kb (Roth et Cristiano, 1997);
- Le risque moins élevé que les adénovirus de provoquer une réponse immunitaire chez l'hôte (Beltinger *et al.*, 2001);
- La capacité de transduire des cellules en mitose uniquement, sans affecter les cellules quiescentes, ce qui est un bénéfice pour certaines applications comme le cancer au cerveau ou dans des organes isolés.

Dans la littérature, plusieurs désavantages sont mentionnés, quoique plusieurs d'entre eux soient atténués ou éliminés par la mise au point des rétrovecteurs:

- Le complément sérique peut inactiver les rétrovirus (Roth et Cristiano, 1997). Les rétrovecteurs incorporant la protéine *vesicular stomatitis virus G* (VSVG) sont relativement résistants à l'inactivation par le complément humain (Ory *et al.*, 1996);
- Des titres élevés de rétoparticules ($>10^7$ particules/ml) sont difficiles à obtenir, ce qui cause un problème pour l'approvisionnement des études cliniques (Roth et Cristiano, 1997). Il est possible de concentrer davantage les rétrovecteurs de type VSVG (Burns *et al.*, 1993). Cependant, l'influence sur le titre est un facteur qui n'est pas toujours complètement élucidé (Byun *et al.*, 1996). Ce dernier commentaire est confirmé par des observations découlant du travail en laboratoire, où l'on constate des variations souvent énormes pour des préparations de rétoparticules contenant des gènes suicides différents, mais préparées exactement dans les mêmes conditions.
- Les récepteurs des rétrovecteurs limitent les cellules qu'ils peuvent cibler (Roth et Cristiano, 1997). Les rétrovecteurs de type VSVG ont une affinité pour une grande variété de cellules eucaryotiques (Galipeau *et al.*, 1999). Leur habileté consiste à reconnaître tout simplement un phospholipide membranaire comme point d'ancrage (Schlegel *et al.*, 1982; Mastromarino *et al.*, 1987).
- Les rétrovecteurs MLV (les plus répandus), incompetents du point de vue répllication, sont incapables d'une transduction secondaire des cellules adjacentes, à cause de la délétion de leurs séquences *gag*, *pol* et *env*. Une transduction plus efficace pourrait être le cas si des rétrovecteurs compétents, i.e. capables de s'autorépliquer, étaient disponibles. La première démonstration de tels vecteurs a été

réalisée avec succès *in vitro* et dans un modèle animal (tumeurs solides), par l'équipe de Logg *et al.* (2001).

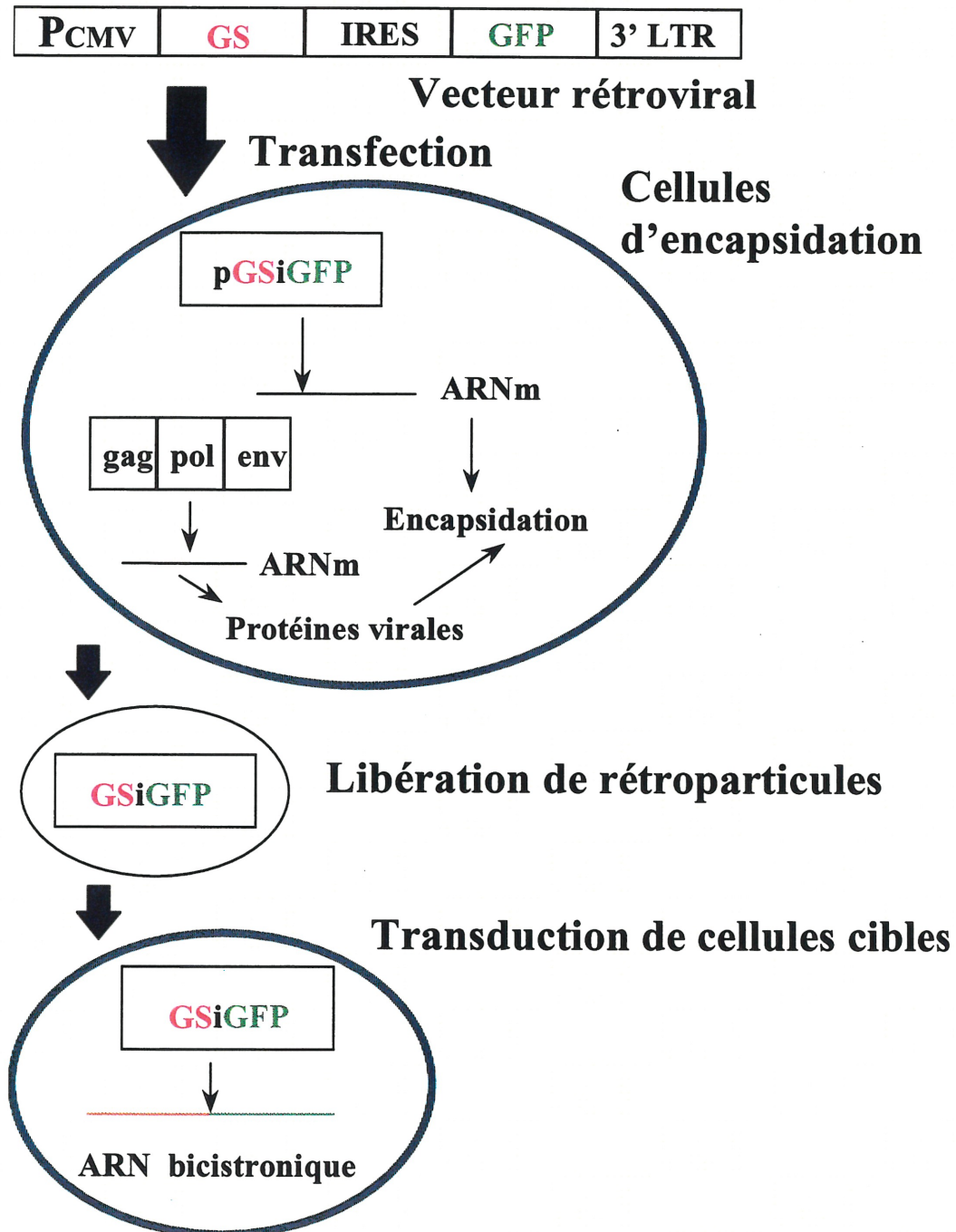


Figure 3.2 Schéma du transfert d'un rétrovecteur dans une lignée cellulaire d'encapsulation pour la production de rétroparticules. PCMV, promoteur cytomégalovirus; GS, gène suicide; IRES, *internal ribosomal entry site*; GFP, *green fluorescent protein*; LTR, *long terminal repeat*.

CHAPITRE 4: L'usage des promoteurs en thérapie génique

Tel que précédemment mentionné au Chapitre 1, le succès des gènes suicides dépend de leur capacité à cibler leur effet thérapeutique dans les cellules tumorales. Pour cette raison, il est difficile d'imaginer des systèmes de gènes suicides sans un promoteur spécifique. Ce dernier est essentiel pour contrôler et maintenir l'expression du gène suicide dans les cellules visées. Leur utilisation permet aussi de minimiser la toxicité de ces systèmes dans les tissus sains, afin de pouvoir éventuellement les administrer de façon systémique (Cooper, 1999; Frederiksen *et al.*, 1999).

Dans le chapitre précédent, il a été discuté que les vecteurs quoique incapables de cibler uniquement les cellules cancéreuses, pouvaient avoir une certaine spécificité à cause d'une affinité pour des tissus. C'est le cas des AAV qui ont une expression efficace dans le muscle squelettique (Xiao *et al.*, 1996). Quant aux rétrovirus, leur spécificité vient de leur caractéristique à intégrer uniquement des cellules en division. Certains chercheurs ont amélioré la spécificité des vecteurs non viraux en ajoutant des ligands comme la vitamine folate, afin de cibler les cellules de carcinome ovarien surexprimant le récepteur folate (Gottschalk *et al.*, 1994). Néanmoins, des efforts supplémentaires sont requis pour orienter le tropisme des vecteurs viraux vers des cellules spécifiques ou des tissus, en modifiant leur enveloppe virale (Beltinger *et al.*, 2001).

Le contrôle transcriptionnel, i.e. l'usage de promoteurs spécifiques, est une alternative pour initier et maintenir la transcription d'un gène suicide dans un système d'expression approprié. Les médiateurs du contrôle transcriptionnel sont des éléments de régulation en *cis* (i.e. qui vont affecter seulement les séquences d'ADN étant situées sur la même

molécule d'ADN), sur lesquels se lient les facteurs protéiques transcriptionnels. En utilisant des séquences régulatrices d'ADN responsables de la transcription des gènes suicides dans les cellules tumorales, ces dernières seront automatiquement ciblées.

Le but de ce chapitre est de décrire brièvement l'usage des promoteurs spécifiques, puisqu'il sera question, au Chapitre 9, de présenter les résultats d'une étude sur un promoteur spécifique de tumeur pour la thérapie génique suicide.

4.1 Les promoteurs spécifiques de tumeur

Cette technique exploite au niveau moléculaire les facteurs protéiques transcriptionnels qui sont exprimés uniquement dans les cellules cancéreuses ou surexprimés dans ces dernières (Miller et Wheelan, 1997). Un exemple convaincant est l'oncogène *erbB-2*, fréquemment surexprimé dans plusieurs types de tumeur dont le carcinome du sein, du pancréas ou du tractus gastro-intestinal. L'expression de cet oncogène n'a cependant pas été constatée dans des conditions non pathologiques à un niveau comparable de celui des cellules cancéreuses (Harris *et al.*, 1994). Les cellules normales ne possèdent pas les protéines transcriptionnelles responsables de la surexpression de *erbB-2*. Chez les cellules cancéreuses, ces protéines se lient au promoteur *erbB-2*, conduisant à l'expression d'un gène d'intérêt (Harris *et al.*, 1994).

Il est important de définir les nuances de ce qu'est un promoteur spécifique de tissu, par rapport à un promoteur spécifique de tumeur. Un promoteur de tissu est actif dans le tissu normal d'origine, aussi bien que dans un tissu tumoral (Cooper, 1999; Nettelbeck *et al.*, 2000). Les promoteurs de tissu ne sont donc pas aussi utiles pour cibler les gènes suicides, à moins qu'il existe une différence nette entre les cellules normales et

tumorales, comme c'est le cas pour plusieurs promoteurs dont le *prostate-specific antigen* (PSA). Le PSA, un marqueur immunochimique utilisé pour diagnostiquer le cancer de la prostate, est normalement produit que par 5% des cellules normales de la prostate (Calydon Inc., 2001). Cependant, presque toutes les cellules cancéreuses de la prostate produisent des niveaux élevés de PSA. Une étude clinique (phase II) utilisant des virus oncolytiques contenant les séquences régulatrices du PSA est d'ailleurs en cours aux États-Unis (Calydon Inc., 2001; Office of Biotechnology/NIH, 2002).

Le concept de promoteur spécifique de tumeur est encore parfois controversé dans la littérature, car l'identification d'un promoteur universel pour tous les types de tumeur est vraisemblablement impossible, à cause de l'hétérogénéité de tous les types de cancer (Roth et Cristiano, 1997; Frederiksen, 1999). Pourtant, la recherche a révélé qu'il existe des gènes ayant peu ou aucune activité dans les cellules saines, mais qui sont surexprimés lors d'un cancer. Ceci est le cas du promoteur du gène encodant l' α -fétoprotéine (AFP), présent dans le foie du fœtus, mais qui redevient actif seulement dans le carcinome hépatocellulaire des adultes humains (Huber *et al.*, 1991; Miller et Wheelan, 1997; Nettelbeck *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2001).

Le fait que j'insiste ici sur les promoteurs de tumeur ne veut pas dire que les promoteurs de tissu sont inutiles pour la thérapie génique du cancer. Un exemple convaincant est l'effet anti-tumoral des séquences régulatrices du gène tyrosinase, ou *tyrosinase-related protein 1* (TRP-1), couplé au gène suicide TK, réalisé dans des modèles animaux de mélanomes (Hart, 1996). Puisque la synthèse de la mélanine est restreinte aux mélanocytes, cela est exploitable pour cibler des systèmes d'activation de promédicaments. Un autre cas intéressant est celui du promoteur de tissu

préproendothéline-1 (PPE-1), ciblant spécifiquement les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins normaux et angiogéniques (Varda-Bloom *et al.*, 2001). Puisque de nombreuses tumeurs solides et métastases dépendent de l'angiogenèse pour leur vascularisation, le promoteur PPE-1 serait certainement très efficace pour prévenir la formation de métastases. Il se rapproche sans aucun doute plus du concept de promoteur universel. Vu le potentiel énorme de ce type de promoteur non seulement pour le cancer, mais aussi pour les maladies vasculaires, certains auteurs ont créé une catégorie pour les promoteurs «dirigés vers l'endothélium» (Nettelbeck *et al.*, 2000).

Les promoteurs spécifiques de tumeur sont souvent classés selon le type de cancer pour lequel ils sont applicables; ceci est le cas du cancer ovarien dont une revue est disponible dans la littérature (Casado *et al.*, 2001). La prochaine sous-section résume la recherche faite sur quelques promoteurs de tumeur utilisés pour le cancer du poumon, puisque le Chapitre 9 présente les résultats d'une étude faite avec un promoteur ayant une activité plus intense au niveau des cellules cancéreuses de poumon.

4.1.1 Les promoteurs ciblant le poumon

Un promoteur assez bien étudié est celui du CEA, une molécule d'adhésion impliquée durant l'embryogenèse et le développement tumoral, tandis qu'elle est normalement non exprimée dans les tissus sains adultes (Frederiksen *et al.*, 1999). Le CEA est présent dans plusieurs carcinomes, dont celui du sein, du poumon et du côlon (Miller et Wheelan, 1997). Plusieurs études ont démontré sa capacité à produire une expression restrictive *in vitro* comme *in vivo* d'un gène thérapeutique dans le carcinome de poumon humain. Dans l'étude de Osaki *et al.* (1994), le gène TK est exprimé sous le contrôle d'un fragment de 445 pb du promoteur CEA, responsable de toute l'activité sélective de

transcription du promoteur. En présence de GCV, une réponse 1000 fois plus sensible a été obtenue chez les cellules humaines d'adénocarcinome du poumon, par rapport à la même lignée cellulaire non transfectée avec le promoteur CEA et le gène suicide TK. Aussi, une lignée humaine de poumon normal et une autre de cancer utérin, toutes deux transfectées avec ce même système étaient résistantes au GCV.

Selon la littérature, d'autres promoteurs seraient plus utiles pour cibler spécifiquement les cellules de cancer pulmonaire à petites cellules (*small cell lung carcinoma*, SCLC). Ceci est le cas du *gastrin-releasing peptide* (GRP), une hormone d'abord isolée de l'estomac du porc qui est exprimée dans le système nerveux, le tractus gastro-intestinal, les poumons, ainsi qu'en grandes quantités dans les SCLC (Yamagushi *et al.*, 1983). Une étude de Inase *et al.* (2000) a démontré que les SCLC transfectées avec le promoteur GRP et le gène suicide TK, étaient 100 fois plus sensibles au GCV *in vitro* que le contrôle non transfecté. *In vivo*, les tumeurs ont complètement régressé chez les souris. L'arginine vasopressine (AVP) est un autre peptide sécrété par les SCLC. Son expression est limitée à l'hypothalamus et elle est strictement contrôlée par l'osmolalité plasmatique. Puisque l'expression de l'AVP est très restreinte au niveau des tissus normaux et que celle-ci ne varie pas selon les taux plasmatiques dans les SCLC, la transcription à partir du promoteur AVP pourrait y être spécifique (Coulson *et al.*, 1999). Des tests réalisés avec un gène rapporteur ont montré une expression 4.9 fois plus grande avec le promoteur AVP, qu'avec un promoteur constitutif dans les SCLC (Coulson *et al.*, 1999).

Les approches pour cibler le poumon sont diverses. Un autre exemple est la construction d'un vecteur adénoviral combinant un promoteur sélectif pour l'endothélium, le *vascular endothelial growth factor receptor type 1* (flt-1), ainsi qu'un récepteur modifié pour la peptidase membranaire exprimée sur l'endothélium vasculaire pulmonaire, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (Reynolds *et al.*, 2001). Le but était d'améliorer l'expression spécifique dans l'endothélium pulmonaire, d'abord grâce au flt-1 ayant une activité élevée dans les cellules endothéliales humaines et d'autre part, grâce à un récepteur adapté pour faciliter l'attachement à l'ACE. Ce récepteur facilite la transduction (infection) dans le poumon au lieu du foie où les adénovirus ont une affinité naturelle, à cause du nombre élevé de récepteurs CAR que ces virus utilisent pour leur adhésion. Le résultat a donné une amélioration de l'ordre de 300,000 fois de l'expression dans le poumon au lieu du foie.

L'observation à partir de marqueurs immunochimiques est également une façon de développer des promoteurs. La calrétine (CAL), une protéine présente dans le système nerveux central et périphérique, est utile dans le diagnostic des mésothéliomes, une tumeur agressive de la cavité pleurale. Une étude de Inase *et al.* (2001) a montré que des cellules de mésothéliome transfectées avec le promoteur CAL et TK étaient 100 fois plus sensibles au GCV que les mêmes cellules non transfectées.

L'activité transcriptionnelle des promoteurs est souvent liée à un fragment clé contenant des sites de liaison pour des facteurs de transcription et non pas à tout le promoteur entier. Dans le cas du promoteur AVP, c'est un fragment de 199 pb, par rapport à un

promoteur entier de 1048 pb, qui est responsable de son activité intense dans les SCLC (Coulson *et al.*, 1999). Plusieurs stratégies sont aussi possibles pour amplifier l'effet de sélectivité des fragments de promoteurs. Une technique simple consiste à faire une construction multimérique (répétitions de séquences) des ces fragments ou encore, de combiner les fragments les plus actifs de quelques promoteurs étant spécifiques pour un tissu cancéreux (Nettelbeck *et al.*, 2000).

Au Chapitre 9, il est question du promoteur hexokinase II, une molécule abondante dans les tumeurs croissant rapidement et ayant une activité de glycolyse élevée, par rapport aux cellules normales. Deux facteurs sont responsables de cette activité: la tendance naturelle de l'enzyme à se lier à la membrane mitochondriale externe et la surexpression de l'enzyme (Mathupala *et al.*, 1995).

4.2 Les promoteurs inductibles pour le cancer

Une autre classe de promoteurs où se développe un intérêt, sont les promoteurs inductibles. Dans la situation où l'on veut éliminer des cellules cancéreuses, le terme inductible ne réfère pas nécessairement à des promoteurs contrôlés de façon pharmacologique par la tétracycline ou les hormones stéroïdiennes (Cooper, 1999; Nettelbeck *et al.*, 2000), mais plutôt à une transcription préférentielle exploitant les conditions pathologiques d'une tumeur solide. Pour cibler des molécules spécifiques à la tumeur, c'est le microenvironnement du tissu tumoral qui est visé dans cette technologie. La déficience en glucose, en oxygène ou un pH acide, sont des conditions connues pour persister dans les tumeurs solides ayant une pauvre vascularisation et pour induire des

protéines comme les *heat shock proteins* (HSP), le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), l'érythropoïétine et les *oxygen-regulated proteins* (Lee *et al.*, 2001).

Le cas du promoteur HSP a fait ses preuves *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, une activation jusqu'à un facteur de 400 fois, par rapport au contrôle, a été observée après un traitement hyperthermique (41-45°C) et le système contenant le promoteur HSP et TK était 50,000 fois plus sensible au GCV que des cellules non traitées (Braiden *et al.*, 2000). La régression de tumeurs *in vivo* a aussi été constatée avec un système utilisant le promoteur VEGF. Les cellules tumorales dans des conditions hypoxiques produisent VEGF pour stimuler l'angiogenèse (Koshikawa *et al.*, 2000).

CHAPITRE 5: Les objectifs de la présente thèse

Objectif général

Développer différents systèmes de promédicaments activables par des gènes suicides pour la thérapie génique du cancer.

Objectif expérimental 1

Exprimer le gène pénicilline amidase G de *Escherichia coli* dans un environnement eucaryotique, afin d'évaluer son application potentielle en tant que gène suicide. Les résultats sont présentés au Chapitre 6.

Objectif expérimental 2

Exprimer le gène hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase de *Trypanosoma brucei* dans des cellules de mammifères, afin d'évaluer son application potentielle en tant que gène suicide. Les résultats sont présentés au Chapitre 7.

Objectif expérimental 3

Initier le clonage du gène adénylosuccinate synthétase de *Trypanosoma brucei*, en tant que gène suicide potentiel. Les résultats sont présentés au Chapitre 8.

Objectif expérimental 4

Étudier l'expression de divers fragments du promoteur de tumeur hexokinase II, afin d'améliorer les systèmes de gènes suicides. Les résultats sont présentés au Chapitre 9.

DEUXIÈME PARTIE:

PRÉSENTATION DES ARTICLES

CHAPITRE 6

A Study on the Expression of Penicillin G Amidase to Activate a Doxorubicin Prodrug

Caroline Trudeau,^{1,2,4} Naciba Benlimame,^{2,4} Ala-Eddin Al Moustafa,^{2,4} Jacques Galipeau,^{3,4} Moulay A. Alaoui-Jamali,^{2,4} Prabhat Arya,⁵ and Gerald Batist^{1,2,4} *

¹Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; ²McGill Centre for Translational Research in Cancer, ³Department of Medicine (Division of Hematology-Oncology), and ⁴Lady Davis Institute for Medical Research of the Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital, Montréal, Québec, Canada H3T 1E2; ⁵Steacie Institute for Molecular Sciences, National Research Council Canada, Ottawa, Ontario, Canada K1A 0R6.

Article soumis à la revue Cancer Chemotherapy and Pharmacology.

* Corresponding author. Mailing address: McGill Centre for Translational Research in Cancer, Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital, Suite D-127, 3755 Côte Ste. Catherine Rd, Montréal, Québec, Canada H3T 1E2. Phone: (514) 340-7915. Fax: (514) 340-7916. E-mail: gbatist@onc.jgh.mcgill.ca.

RÉSUMÉ

Une approche potentielle pour améliorer la sélectivité de la chimiothérapie et en éliminer les effets secondaires systémiques, est de convertir les agents de chimiothérapie cytotoxiques en des promédicaments pouvant être activés dans un tissu spécifique. Dans cette étude, nous avons démontré que l'enzyme pénicilline amidase G (PGA) exprimée par *Escherichia coli*, peut activer un promédicament non toxique constitué d'un dérivé phénylacétamide de doxorubicine (prodox), un agent de chimiothérapie, en une drogue cytotoxique, par un facteur de 11 à 41 fois par rapport aux contrôles. La maturation de l'enzyme PGA est inhabituelle pour une bactérie, quoiqu'il a été rapporté qu'elle est autocatalytique ou que son activité pouvait être reconstituée à partir des sous-unités non identiques du gène, exprimées séparément. Nous avons donc testé ces deux hypothèses. Grâce à des rétrovecteurs exprimant PGA dans des cellules de mammifères, la présence des sous-unités α et β de l'enzyme a été confirmée par *RT-PCR* et une étude de localisation cellulaire. Nous avons montré que la maturation de PGA n'est pas autocatalytique et qu'il n'y avait pas d'interaction entre les sous-unités matures, ce qui explique l'absence d'activation de la prodox lors des tests de cytotoxicité. Notre étude propose qu'une enzyme PGA fonctionnelle a besoin d'un élément appartenant essentiellement à un environnement intracellulaire bactérien.

ABSTRACT

Conversion of cytotoxic chemotherapy agents to prodrugs that can be activated in a specific tissue target is a potential approach to increase chemotherapy selectivity and overcome systemic side effects. We report herein that the enzyme penicillin G amidase (PGA) expressed by *Escherichia coli*, can convert a nontoxic prodrug made of a phenylacetamide derivative of doxorubicin (prodox), a chemotherapeutic agent, into a toxic drug by a 11- to 41-fold compared to controls. The processing of PGA is uncommon in bacteria, but since it has been reported that it is autocatalytical or its activity could be reconstituted from separately expressed non identical subunits of the gene, we tested both possibilities. We developed retroviral systems that express PGA in mammalian cells and the α and β subunits of the enzyme were confirmed by RT-PCR and localization studies. We showed that the processing of PGA is not autocatalytical and there was no interaction between mature subunits, which explains the lack of prodox activation in the cytotoxicity assay. Our study suggests that a functional PGA enzyme might require an element that belongs to the bacterial intracellular environment.

INTRODUCTION

The bacterial enzyme penicillin G amidase (PGA; EC 3.5.1.11) has an important industrial role, particularly in the production of 6-aminopenicillanic acid (6-APA), the starting compound for the synthesis of semisynthetic penicillins (9,22,24). This enzyme is produced by several strains of *Escherichia coli* and a wide range of other species of bacteria, and it is also found in fungi and yeast. The physiological role of PGA is unclear, but the early work done by Hamilton-Miller demonstrated that the bacterial PGA enzymes hydrolyze the side chain of benzylpenicillin (penicillin G), in preference to that of phenoxymethylpenicillin (penicillin V), while the fungal penicillin amidase enzymes show the opposite (24).

The PGA gene has an uncommon structure (Fig. 6.2A, *Top*, p. 84) and processing in bacteria. After maturation, a polypeptide precursor of 95 kDa gives an heterodimer composed of α and β subunits of 24 and 65 kDa, respectively, that constitute the active enzyme (18). The post-translational maturation of PGA is the result of three proteolytic cleavages done in the following order: 1) the excision of a signal peptide of 26 amino acids, after the translocation of the polypeptide precursor into the periplasm; 2) a cleavage between the N-terminus of the β subunit and the connector peptide of 54 amino acids; and 3) the excision of the connector peptide by a cleavage at the C-terminus of the α subunit (18,24). It has been reported that this processing is autocatalytical or done at the cytoplasmic membrane (3,9). Furthermore, the synthesis of an active PGA in *E.coli* L-forms excludes the possibility of a processing in the periplasmic space, since L-forms do not have a cell wall or such a space and consequently, do not have any specific proteases to execute the proteolytic cleavages

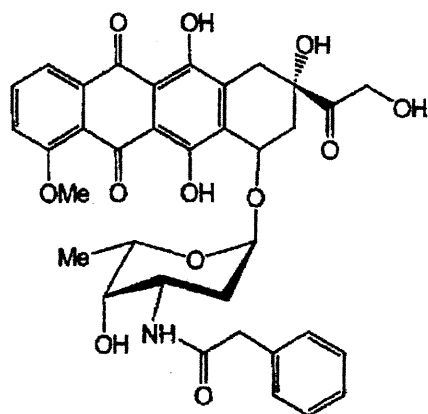
(9). Also, it has been demonstrated that the reconstitution of PGA activity in the cytoplasm of *E.coli* by the expression of the two separate subunits is possible within the same cells (4).

The focus of our study is to examine the processing of PGA into mammalian cells, in order to use it as a potential intracellular enzyme to activate a prodrug in cancer gene therapy. Since the PGA enzyme has the capacity to hydrolyze substrates that have a phenylacetyl side chain (6,22), we synthesized a phenylacetamide derivative of doxorubicin as the prodrug (prodox; Fig. 6.1A, p. 74). Retroviral systems designed to express the *E.coli* PGA type G cDNA were tested for their potential to activate the nontoxic prodox into its cytotoxic metabolite, doxorubicin (dox; Fig. 6.1B, p. 74), a well-known chemotherapy drug, active throughout the cell cycle (16). We have demonstrated that the mammalian cells modified to express PGA do not show any activity of this enzyme, because of an incorrect post-translational processing of the protein, or a lack of interaction between subunits. Our data support the fact that the processing of a functional PGA might require an essential element from the bacterial environment.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of prodox. A mixture of doxorubicin hydrochloride (dox) (Adriamycin, Pharmacia & Upjohn, Don Mills, ON, Canada) and lactose (contained about 16% of dox) was dissolved in a NaHCO₃ solution (0.1M, pH 9.0). It was cooled to 0°C and 1.2 mmol of benzoyl chloride was added per 1.0 mmol of dox. The whole mixture was stirred at 0°C for 3 to 4 hr and then, 100 ml of chloroform was added. The

A



B

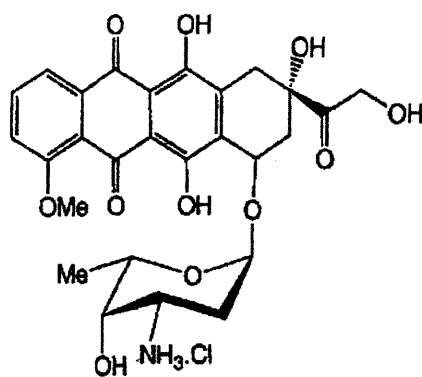


FIG. 6.1 Chemical structures of (A) prodoxorubicin (molecular weight of 661.3 g); and (B) doxorubicin (molecular weight of 571.3 g).

organic layer was separated, washed thoroughly twice with a buffer solution (pH 7.0), and then collected to dry over MgSO₄. The crude product obtained after evaporation of the organic layer was crystallized in CHCl₃:isopropylalcohol (2:1). The molecular structure of prodox was checked by mass spectroscopy (MS) with the electrospray technique, giving a molecular weight of 661.3 g (M+1), as opposed to 571.3 g for dox alone. The purity of the N-benzoylderivative of dox was checked by HPLC (Waters Delta Prep 4000 System). The HPLC technique also confirmed that the prodox penetrated the cells and remained stable for an incubation period of 24 hr.

Cells and cell culture. The human lung carcinoma cell line A549 (obtained from the American Type Culture Collection [ATCC], Rockville, MD) was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin (PS). The monkey fibroblast cell line COS-1 (ATCC) was also maintained in the abovementioned medium. The human embryonic kidney 293GPG retroviral packaging cell line (14), kindly provided by R.C. Mulligan (Children's Hospital, Boston, MA) was maintained in 293 media: DMEM supplemented with 10% heat inactivated FBS, 0.3 mg/ml neomycin, 2 µg/ml puromycin, 1 µg/ml tetracycline, and 1% PS. All cell lines were maintained at 37°C under 5% CO₂.

Constructs design. pPGAiGFP was constructed by inserting the complete sequence of the PGA gene into the multiple cloning site of AP2 (8), a bicistronic, nonsplicing murine retroviral vector that expresses an enhanced green fluorescent protein (Fig. 6.2A, *Top*, p. 84). A 2902 bp fragment containing the entire PGA cDNA was excised by a HindIII-SmaI digest from the pXL20 plasmid (15) (a generous gift

from Rhône-Poulenc Rorer (Vitry sur Seine, France), and ligated into the corresponding sites of pBluescript II SK (Stratagene, LaJolla, CA), used as a shuttle plasmid (pPGA/BS). A fragment of 2927 bp was excised by an XhoI-BamHI digest from this shuttle plasmid, and was ligated into the AP2 cut vector to generate pPGAiGFP.

For p α iGFP, the connector peptide and β subunit were removed, and a stop codon was added at the C-terminus of the α subunit (Fig. 6.2A, *Middle*, p. 84). First, a 310 bp fragment was subjected to PCR amplification from the pPGA/BS plasmid with the forward and reverse primers 5'-CCAATCCAGAGACGCTCTTA-3' and 5'-CGCGGATCCTTATGCTGTTTGCGA-3' (stop codon underlined). After an Eco47III-BamHI digest, the fragment was ligated into an AP2 derived cut construct containing the complete sequence of PGA, but where the signal peptide had been previously removed (pPGA-SiGFP).

For p β iGFP, the connector peptide was also removed and a start codon was added at the N-terminus of the β subunit. As described for p α iGFP, a fragment of 374 bp was first amplified by PCR, but with the forward and reverse primers 5'-CCGCTCGAGACCATGAGCAATATGTGG-3' (start codon underlined) and 5'-CACCGTACGCCAGACAGTAA-3'. After an XhoI-SplI digest, this fragment was ligated into the corresponding sites of pPGA-SiGFP, in order to generate p β iGFP (Fig. 6.2A, *Bottom*, p. 84).

The construct pPGA-SiGFP, was generated by multiple steps. In order to add Kozak sequence (10) and remove the signal peptide, a fragment of 201 bp was first amplified by PCR from pPGA/BS with the forward and reverse primers 5'-CCGCCATGGAGCAGTCGTCAAG-3' (NcoI site and start codon underlined) and 5'-

GCCAGTAGTTACGACGGATA'-3. After an NcoI-EcoRV digest, this fragment was subcloned into the pSP-luc+ shuttle vector (Promega, Madison, WI). An HindIII-EcoRV digest was subsequently performed on this latter shuttle construct to excise a 208 bp fragment that was ligated into pPGA/BS, a new version without the signal peptide. Finally, an XhoI-BamHI digest excised a 2,9 kb fragment from that latter construct, that was ligated to the AP2 cut vector to generate pPGA-SiGFP.

For the constructs that encode a fusion protein, they were all previously cloned into a shuttle vector providing a C-terminal *myc* epitope or a N-terminal *Met-flag* sequence, in frame with the construct of interest. To study the processing of the PGA gene, a 2529 bp fragment was excised by a HpaI partial digest and HindIII digest from the pPGA/BS shuttle plasmid described above and ligated into the HindIII-EcoRV-cut pcDNA3.1/*Myc*-His(+)*C* vector (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). From this latter construct, a 2462 bp SphI-PmeI fragment including the *myc* epitope was ligated into the SphI-SmaI sites of pPGA/BS. Finally, the *PGAmyc* fusion construct excised by an XhoI-BamHI digest was subcloned into AP2 to create pPGAmyciGFP (Fig. 6.4A, *Top*, p. 89).

To create a *flag α* fusion, a HindIII-BamHI fragment (696 bp) was excised from p α iGFP and was ligated into the pFLAG-CMV-2 vector (Sigma, St.Louis, MO). From this latter construct, a fragment of 700 bp was amplified by PCR with the forward and reverse primers 5'-CCGCTCGAGTACCATGGACTACAA'-3 (XhoI site underlined) and 5'-ACCCGGGATCCTTATGCTGTTTGC'-3, in order to create an XhoI site upstream of the *Met-flag* fusion. After an XhoI-BamHI digest, this fragment was ligated into the AP2 cut vector to generate pflag α iGFP (Fig. 6.4A, *Middle*, p. 89).

To create a β myc fusion, an XhoI-HpaI fragment was excised from p β iGFP and ligated into the XhoI-EcoRV cloning sites of the pcDNA3.1/*Myc*-His(-)B vector (InVitrogen). After an XhoI and AflIII (blunted) digest of this latter construct, a fragment of 1741 bp including *myc* was excised and ligated into the XhoI and AsuII (blunted) sites of AP2 to generate p β myciGFP (Fig. 6.4A, *Bottom*, p. 89). Restriction and cloning enzymes were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC, Canada) and MBI Fermentas (Burlington, ON, Canada). For the amplification by PCR, the PFU Turbo DNA Polymerase was obtained from Stratagene.

Production of retroviral particles containing pPGAiGFP, p α iGFP and p β iGFP constructs. Recombined vesicular stomatitis virus G (VSVG) pseudotyped retroparticles were generated by stable transfection of the 293GPG packaging cell line (14). Stable transfection was done by cotransfection of 2 μ g of FspI linearized retrovector constructs and 1:25 ratio of pJ6 Ω Bleo plasmid (12). Transfected cells were subsequently selected in 293GPG media supplemented with 100 μ g/ml zeocin (InVitrogen). Resulting stable producer populations were used to generate virus. All viral supernatants were filtered with 0.45 μ m syringe-mounted filters (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) and stored at -80°C. Concentration of VSVG retroparticles was done as previously described (8).

Transduction of cells, flow cytometry and cell sorting for pPGAiGFP, p α iGFP and p β iGFP constructs. A549 and COS-1 cell lines were plated at a density of 2×10^4 cells per well in a 6-well plate (Costar, Cambridge, MA) and incubated for 24 hours at 37°C under 5% CO₂. The medium was removed and replaced with one ml of growth medium and concentrated viral supernatant (titers in cfu/ml of 5.6×10^5 , $0.3 \times$

10^5 , 5.8×10^5 , 1.3×10^5 for AP2, pPGAiGFP, poiGFP and pβiGFP, respectively). Polybrene (Sigma) was added to a final concentration of 6 μg/ml. This procedure was repeated for at least 3 consecutive days. Stable transduced cells were expanded and mixed populations of transduced cells were used for all the experiments. Flow cytometry with a Epics XL/MCL device (Coulter, Hialeah, FL) was performed within two weeks after transduction to ascertain retrovector expression and gene transfer efficiency as measured by the EGFP fluorescence. Transduced and cotransduced cells were sorted on the basis of green fluorescence with a Cytomation MoFlo facs/sorter (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, QC, Canada).

RT-PCR amplification for α and/or β detection. Stably transduced COS-1 and A549 cells with AP2, pPGAiGFP, poiGFP and/or pβiGFP constructs were washed with phosphate buffer saline (PBS) and RNA was directly extracted with TRIZOL reagent, according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). cDNA was subsequently produced with the First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas). The forward and reverse primers used for the PCR reactions were: for α, 5'-CTACTGGCCGGATGCTATC-3' and 5'-CAATTTTCGCTAGTGCTA-3' to generate a fragment of 247 bp; for β, 5'-AAAAGCAAAGCCCAGGATGCCGA-3' and 5'-CACCGTACGCCAGACAGTAA-3' (fragment of 348 bp); for GAPDH, 5'-CCGGGAAACTGTGGCGTGAT-3' and 5'-GAAGGCCATGCCAGTGAGCT-3' (fragment < 250 bp).

Measurement of activity (cytotoxicity assay). The enzymatic activity of PGA is reported by the cytotoxicity assay, i.e. the capacity to activate the prodrug into a cytotoxic metabolite. The cytotoxic effect of prodox and dox were determined using a

sensitive colorimetric assay that measures the protein content of viable cells (20). Stably transduced cells with AP2 (empty retrovector), pPGAiGFP, or cotransduced with p α iGFP and p β iGFP constructs, were plated in 100 μ l of medium at a density of 2×10^3 cells per well in 96-well plates (Costar). Plates were then incubated for 24 hours at 37°C under 5% CO₂. One hundred μ l of fresh culture medium containing dox (Pharmacia & Upjohn) or prodox, were added to achieve a range of concentrations from 0.01 to 20 μ M. All drugs were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the final concentration of DMSO was less than 0.5% of cell culture medium. All drugs were protected by light. Cells were incubated for 24 hr, and the medium containing drug was replaced by fresh medium. After 48 hr, the sulforhodamine B (Sigma) assay was carried out as described (20). For the prodrug activation control, one μ l (1.7 U)/well of PGA purified protein (Sigma) was added to the medium. The absorbance was measured at 490 nm with a universal microplate reader ELx800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). Experiments were repeated at least twice, in multiple wells.

Transfection for pPGAmyciGFP, pflag α iGFP and p β myciGFP constructs.

COS-1 cells were plated at a density of 2×10^5 cells/well in 6-well plates (Costar) and incubated for 24 hr at 37°C under 5% CO₂. Transient transfection was done by overlaying a mixture of lipofectamine (InVitrogen) and 0.5 picomole of AP2, pPGAmyciGFP, pflag α iGFP, or p β myciGFP constructs, for an incubation period of 5 hr. Cotransfection with pflag α iGFP and p β myciGFP was performed the same way. Cells were further incubated with fresh medium for 48 hr and prepared as stated below for analysis.

Western blot and immunoprecipitation analysis. Cells transfected with fusion constructs were washed with PBS, collected by trypsinizing, and centrifuged for 2 min at 13,000g. Each pellet was resuspended in lysis buffer (0.01M Tris-HCl buffer pH 8.0, supplemented with protease inhibitors), incubated on ice for 15 min, and centrifuged for 15 min at 13,000g. The supernatant was collected and assayed for protein content. For Western analysis, 30 μ g of protein were used. For immunoprecipitation, 200 μ g of protein were incubated (4°C, 1hr) with a cross-linked antibody suspension (G-sepharose beads previously incubated with the antibody, dimethyl pimelimidate dihydrochloride, and 0.2M triethanolamine pH 9.0, washed and resuspended in lysis buffer). All samples were loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes as described (17). Fusion proteins were detected with a mouse monoclonal antibody against *flag* (M2; Sigma), or *myc* (InVitrogen) that were used at a dilution of 1:2000, or 1:5000, respectively. Proteins were visualized with the ECL immunodetection system (Amersham Pharmacia Biotech). The mouse monoclonal anti-actin antibody (clone C4) that was used as an internal control is from Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada).

Immunofluorescence microscopy. COS-1 cells were plated on coverslips at a density of 2×10^5 cells/well and the transient transfection was done as described earlier. After 2 days, the cells were gently washed with PBS and fixed with paraformaldehyde 3% (w/v) for 5 min, followed by precooled methanol (-20°C) for 15 min. The cells were then washed several times with PBS and incubated for 1hr with a mixture of blocking solution containing 2% bovine serum albumine (BSA), 2% normal goat serum, and 0.2% gelatin in PBS at room temperature to reduce non-specific binding. The cells were then

incubated with the primary antibody (mouse monoclonal against *flag* or *myc* at 1:100, or 1:500, respectively) for 1 hr at room temperature. After several washes with PBS supplemented with BSA 0.2%, the cells were incubated with an appropriate secondary antibody conjugated to Texas Red at 1:1000 (Jackson Laboratories, West Grove, PA) for 30 min. The coverslips were mounted with Airvol (Air Products and Chemicals, Allentown, PA) and analyzed with a Zeiss LSM 410 inverted confocal microscope (Institut Universitaire de Gériatrie de Montréal, Montréal, QC, Canada).

Northern blot analysis. RNA was extracted as described earlier, from stably cotransduced COS-1 and A549 cells with p α iGFP and p β iGFP constructs. Twenty μ g of total RNA were electrophoresed through a 1% agarose formaldehyde gel and transferred on a HYBOND membrane (Amersham Pharmacia Biotech). The probes for α and β were produced by PCR amplification (with p α iGFP and p β iGFP as templates), using the same primers mentioned before for the α and/or β detection. The corresponding products were purified on an agarose gel, then 32 P-labeled with an oligolabeling kit (Amersham Pharmacia Biotech). The membrane was hybridized overnight with probe at 42°C and autoradiographed. The 18S probe (600 bp cDNA fragment from rat ribosomal RNA) was kindly provided by Hung The Huynh (National Cancer Centre, Singapore). The densitometry of the α , β , and 18S bands was determined with the NIH Image software and a UMAX Super Vista scanner.

Statistical analysis. Student t-test was used to compare IC₅₀ values for the cytotoxicity assay and the densitometry results from the Northern blot. Differences were considered significant at $P \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Detection of the PGA gene in transduced cells and lack of enzymatic activity.

We have designed bicistronic retroviral vectors that express our gene of interest, PGA from *E.coli*, and the EGFP marker (Fig. 6.2A, p. 84). Using EGFP fluorescence as a measure of gene transfer efficiency, we achieved a high expression in polyclonal population of cells (>80% EGFP positive; data not shown). Since we did not have access to reliable or commercial antibodies to detect the PGA protein, RT-PCR technique was used to detect the presence of the α and/or β subunit of the gene in the stably transduced cells. The integration of PGA in cells transduced with pPGAiGFP (complete sequence of the gene) was shown by the presence of the two subunits α and β (Fig. 6.2B-C, lanes 9-10, p. 85), using cells transduced only with the α subunit (Fig. 6.2B-C, lane 5, p. 85) or the β subunit (Fig. 6.2B-C, lane 8, p. 85) as controls. The integration of both subunits in cotransduced cells with p α iGFP and p β iGFP, was confirmed in the same way (Fig. 6.2B-C, lanes 11-12, p. 85), with primers specific to each nonidentical subunit and the same positive controls as for pPGAiGFP. Both mature subunits are essentially required for the potential activation of the prodrug, since they have no detectable activity on their own. The α subunit confers the specificity for the substrate side chain and β provides the catalytic site at its N-terminus (7,18).

As previously reported for *E.coli*, when expressing the α or β subunit of the gene from two separate plasmids within the same cells, the PGA activity could be reconstituted in the cytoplasm, and this was shown by an assay monitoring the hydrolysis of a substrate by cell extracts (4). In contrast, we could not see any

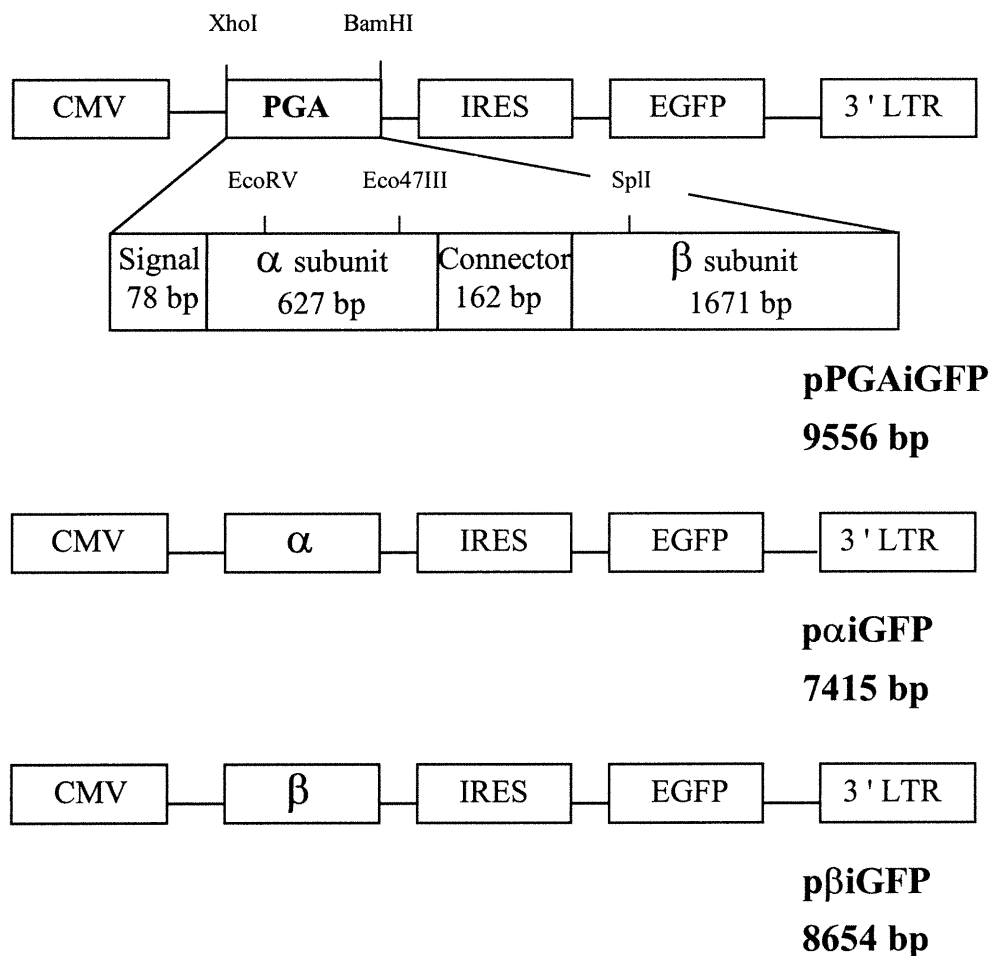


FIG. 6.2 (A) Schematic representation of the constructs that encode PGA, α or β subunit. *Top*: pPGAiGFP retrovector encodes the PGA gene. The structure of the PGA gene is shown, according to (18). *Middle*: p α iGFP encodes the α subunit of the gene. *Bottom*: p β iGFP encodes the β subunit of the gene. Some restriction sites used to subclone are indicated, as described in Materials and Methods. CMV, cytomegalovirus promoter element; IRES, internal ribosomal entry site; EGFP, enhanced green fluorescent protein; LTR, long terminal repeat.

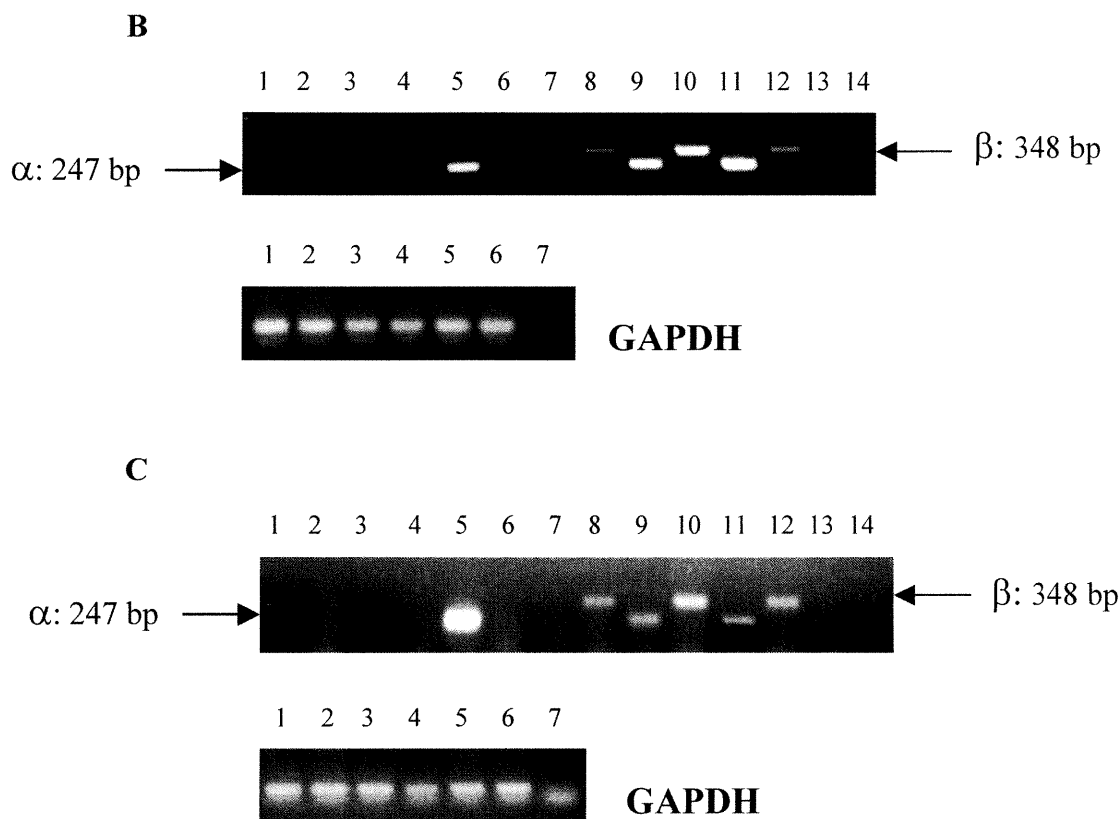


FIG. 6.2 (B and C) RT-PCR analysis of the cells transduced with the constructs previously shown in (A), p. 84, designated as α , β , PGA, or CO for the cells cotransduced with both α and β . The 247 bp band shows the integration of the $p\alpha iGFP$ construct and the 348 bp band corresponds to the $p\beta iGFP$ construct. GAPDH was detected as an internal control (< 250 bp). Shown in (B) are COS-1 cells and in (C), A549 cells: 1, Wild type (WT)/primers for α ; 2, WT/primers for β ; 3, AP2 (empty retrovector)/primers for α ; 4, AP2/primers for β ; 5, α /primers for α ; 6, α /primers for β ; 7, β /primers for α ; 8, β /primers for β ; 9, PGA/primers for α ; 10, PGA/primers for β ; 11, CO/primers for α ; 12, CO/primers for β ; 13, negative control/primers for α ; 14, negative control/primers for β . For GAPDH: 1, WT; 2, AP2; 3, α ; 4, β ; 5, PGA; 6, CO; 7, negative control.

difference in the PGA activity when COS-1 and A549 cells cotransduced with p α iGFP and p β iGFP were exposed to the prodox after a 24 hr exposure, in respect to their controls incubated with dox, a toxic drug (data not shown).

When comparing the IC₅₀ values of COS-1 and A549 cell lines incubated with the compounds (Fig. 6.3A-B, p. 87), the prodox is 13-fold less cytotoxic than the free dox. The addition of PGA purified protein to the medium containing the prodox increases the toxicity by a 11- or 41-fold for COS-1 and A549 cell lines respectively, compared to the cells incubated with prodox alone (Fig. 6.3A-B, p. 87), when comparing their IC₅₀ values. These results show that the prodrug can be significantly activated by the PGA enzyme ($P < 0.01$). Also, the addition of the PGA enzyme to the medium containing the free dox shows no additional toxicity compared to the cells incubated with the free dox alone, as revealed by the lack of difference between their IC₅₀ values. Therefore, the cells are not killed by the presence of the PGA enzyme by itself.

PGAmyc expression in transfected cells and absence of post-translational processing. The expression of the PGA protein (i.e. complete sequence) was confirmed by Western blot, with the design of a PGAmyc fusion construct detected by a *myc* antibody, for the reason mentioned before. As shown in Fig. 6.4C (lane 5), p. 91, a band of about 95 KDa was obtained in cells transfected with pPGAmyciGFP. A band of this size corresponds to the precursor of PGA (2,9,13,18,24). This result confirms the absence of an autocatalytical post-translational processing of PGA in mammalian cells and explains the lack of cytotoxicity observed in stably transduced cells with pPGAiGFP in presence of prodox, since the two mature subunits were not processed from the precursor.

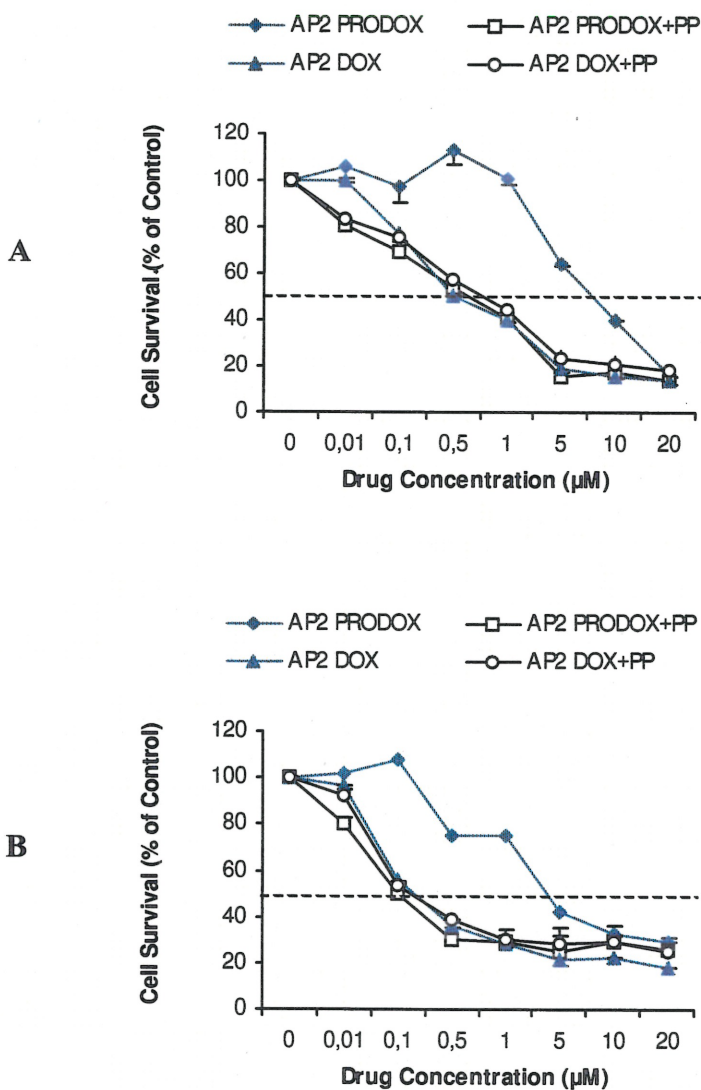


FIG. 6.3 Cell survival after treatment with doxorubicin (DOX) or its phenylacetamide derivative (PRODOX) (incubation of 24 hr). Cells were stably transduced with the empty retrovector (AP2). The addition of PGA purified protein (PP) showed a decrease in cell survival after exposure to the prodox, compared to the prodox alone. In (A), curves for COS-1 cell line. In (B), curves for A549 cell line. Data points indicate mean survival measured in at least two independent experiments done in multiple wells; bars indicate SE.

Flag α and β myc expression in cotransfected cells and non interaction of the subunits. The expression of the small subunit *flag α* was confirmed in cells cotransfected with *pflag α iGFP* and *β myciGFP* (Fig. 6.4B, lane 7, p. 90) although its size seemed slightly bigger than expected (mol. mass α = 24 KDa, according to 18). The identity of this band as *flag α* in cotransfected cells was confirmed by its presence in control cells transfected only with *pflag α iGFP* (Fig. 6.4B, lane 5, p. 90). The fact that the α subunit expressed in *E.coli* cells has a larger size than that present in purified enzyme has been previously mentioned (2), which may explain this observation. The fusion *β myc* was confirmed by a band of about 65 KDa as expected, according to (18), in cotransfected cells (Fig. 6.4C, lane 9, p. 91), and in control cells transfected only with *p β myciGFP* (Fig. 6.4C, lane 7, p. 91). Furthermore, immunofluorescence microscopy revealed that the cellular localization of *flag α* and *β myc* proteins is diffuse in the cytoplasm of cotransfected cells (Fig. 6.5B and D, respectively, p. 92), as opposed to control cells transfected only with the empty retrovector (Fig. 6.5A and C, p. 92).

The coimmunoprecipitation analysis showed no interaction between the mature subunits, since only one of the two bands (*flag α* or *β myc*) could be visualized on SDS-polyacrylamide gels with extracts from cells cotransfected with *pflag α iGFP* and *β myciGFP* (Fig. 6.4B, lane 8, p. 90, and C, lane 10, p. 91). This absence of any association between α and β subunits may explain the lack of cytotoxicity observed when the cotransduced cells were exposed to the prodrug. The design of all fusion constructs (and also of the original constructs *pPGAiGFP*, *p α iGFP* and *p β iGFP*) was carefully done according to the information available in the literature, in order not to

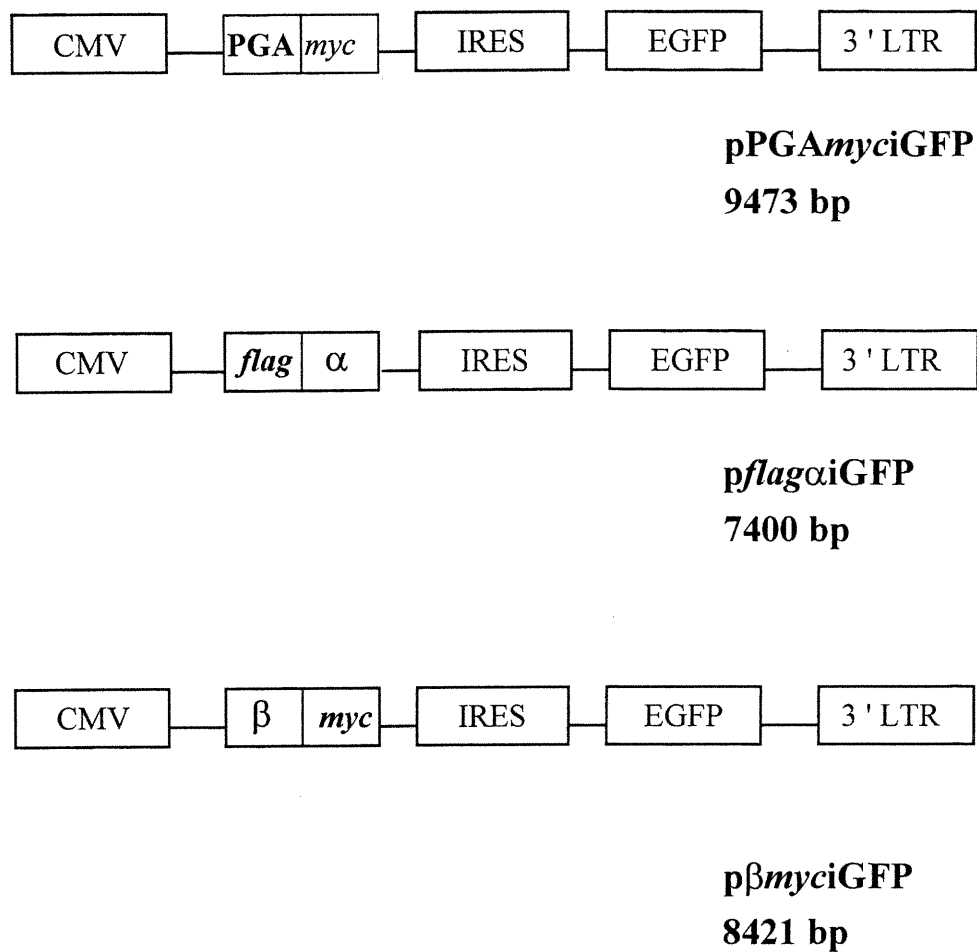


FIG. 6.4 (A) Schematic representation of the constructs that encode a fusion protein. *Top:* pPGAmyciGFP retrovector incorporates the coding sequences for PGA and *myc* fusion protein; *Middle:* pflagαiGFP includes the α subunit of PGA with a *flag* fusion protein. *Bottom:* pβmyciGFP includes the β subunit of PGA with a *myc* fusion protein.

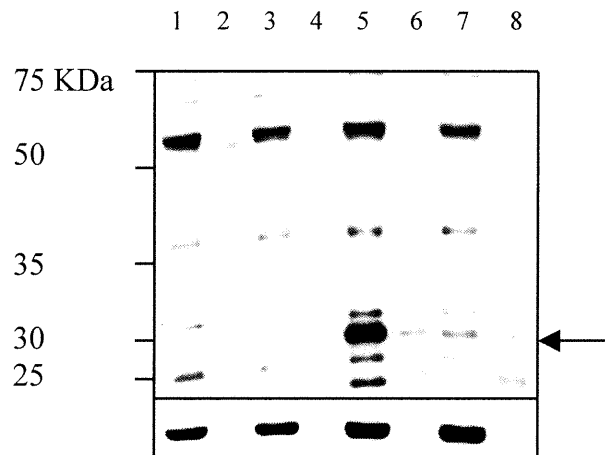


FIG. 6.4 (B) Western blot and immunoprecipitation analysis of fusion protein expression in COS-1 cells transfected with the constructs previously shown in (A), p. 89, designated below as *flagα*, *βmyc*, *PGAmyc*, or *CO* for the cells cotransfected with both *flagα* and *βmyc*. Actin was detected as an internal control. Shown above are extracts from cells (if immunoprecipitated with *flag* antibody, is indicated by IP): 1, WT; 2, WT/IP; 3, AP2 (empty retrovector); 4, AP2/IP; 5, *flagα*; 6, *flagα*/IP; 7, *CO*; 8, *CO*/IP. The arrow indicates a band that corresponds to α (mol. mass = 24 KDa, according to 18).

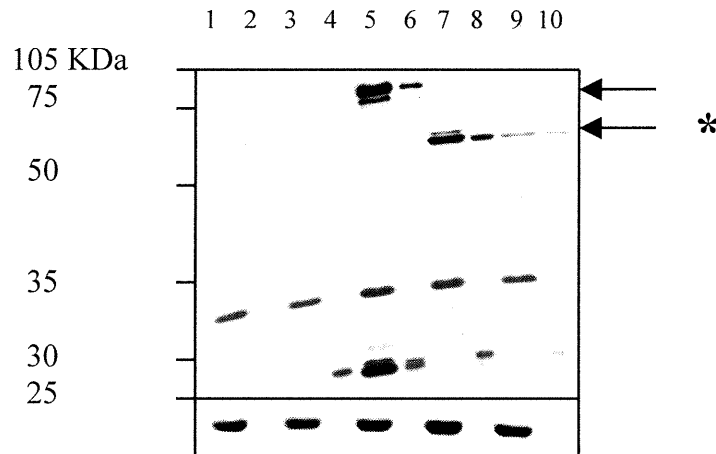


FIG. 6.4 (C) Western blot and immunoprecipitation analysis of fusion protein expression in COS-1 cells transfected with the constructs previously shown in (A), p. 89, designated below as *flagα*, *βmyc*, *PGAmyc*, or *CO* for the cells cotransfected with both *flagα* and *βmyc*. Actin was detected as an internal control. Shown above are extracts from cells (if immunoprecipitated with *myc* antibody, is indicated by IP): 1, WT; 2, WT/IP; 3, AP2; 4, AP2/IP; 5, *PGAmyc*; 6, *PGAmyc*/IP; 7, *βmyc*; 8, *βmyc*/IP; 9, *CO*; 10, *CO*/IP. The arrow indicates a band that corresponds to the *PGA* precursor (mol. mass = 95 KDa, according to 18). The arrow with a star indicates a band for *β* (mol. mass = 65 KDa, according to 18).

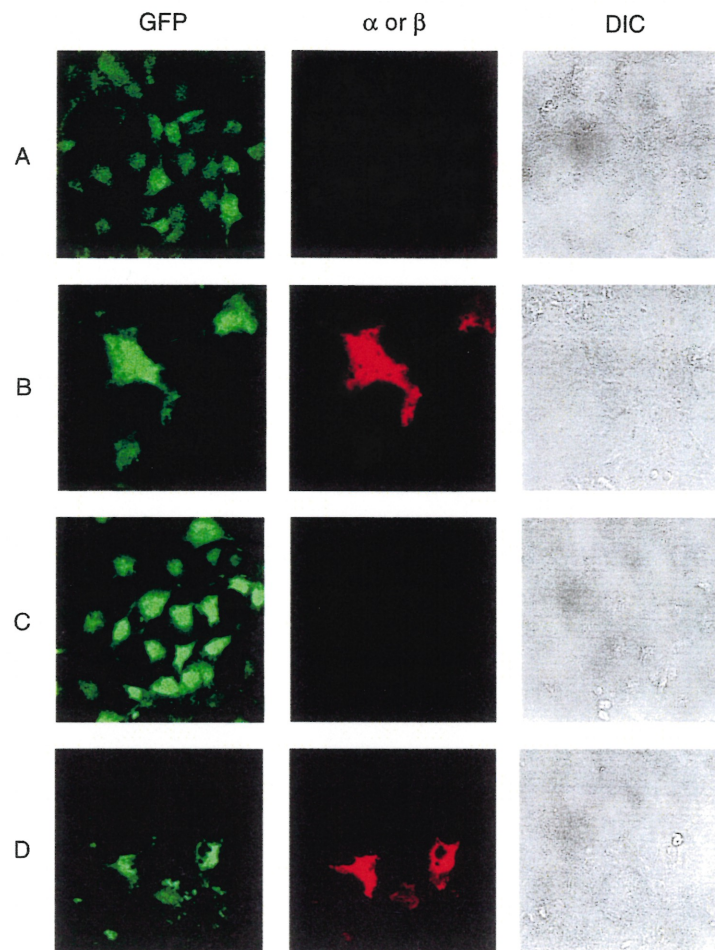


FIG. 6.5 Diffuse cytoplasmic localization of the *flagα* (**B**) or *βmyc* (**D**) fusion protein (in red) after the COS-1 cells were cotransfected and prepared for immunocytochemistry. Shown in (A and C) are cells transfected with the empty retrovector (AP2), and prepared with the *flag* (A), or the *myc* antibody (C). GFP, green fluorescent protein; DIC, differential interference channel.

delete or modify any site that would play a crucial role in the processing or catalytic activity of PGA. The serine residue of the N-terminus of the β subunit (β_1) is certainly the most studied of these sites. Its change to a cysteine inactivates the enzyme, and some substitutions prevent the processing of the enzyme (5,7), although some authors reported that several mutant precursors are processed to mature and active enzymes (19). More recently, the lysine (β_{10}) and the glycine (β_{21}) residues of the β subunit were mentioned to be necessary to the maturation of the PGA precursor (11,23).

The present study establishes that the post-translational processing of PGA into mature subunits is not autocatalytical in mammalian cells, as it has been reported for bacteria (3,9). Since the maturation of the PGA enzyme occurs in a wide range of bacterial species including L-forms, it is inferred that no specific proteases are required for the processing of the precursor (9,24). However, our results strongly suggest that chaperones that have been reported for secretory proteins in some bacteria might be involved in the folding of the precursor before further processing (21). The lack of enzymatic activity also observed in mammalian cells transduced with both mature subunits, also suggests that an element that belongs to the bacterial intracellular environment is also missing in order to have the right conformation that will lead to an association between α and β . Even though PGA is an enzyme stable at various temperatures (9), has noncovalent interactions between associated α and β subunits (1,2), and our results showed a cytoplasmic localization for both subunits in cotransfected cells, we could not reproduce the PGA activity in mammalian cells by expressing the two mature subunits from two separate vectors, as described for *E.coli* (4). Further analysis from a Northern blot done for stably cotransduced A549 and COS-1

cells has shown no significant difference ($P > 0.1$) for the level of RNA produced by each mature subunit, when comparing the relative density of α to its 18S band, with the relative density of β to its 18S band (data not shown). To our knowledge, this is the first study on the expression of PGA in mammalian cells, and although additional molecular studies are required on the intracellular processing, it provides basic data to explore the elements necessary to the maturation of PGA, which could provide potential implications for the selective activation of prodrugs in the context of therapeutic applications.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Rhône-Poulenc Rorer (Centre de Recherche de Vitry-Alfortville, Vitry sur Seine, France) for the generous gift of the pXL20 plasmid. This work was supported in part by grants from the Canadian Breast Cancer Research Initiative, the National Cancer Institute of Canada, and the Natural Science and Engineering Research Council of Canada. C.T. is supported by studentships from la Faculté des Études Supérieures, Université de Montréal (Montréal, QC, Canada).

REFERENCES

1. Böck, A., Wirth, R., Schmid, G., Schumacher, G., Lang, G., and Buckel, P. 1983. The penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105 consists of two dissimilar subunits. FEMS Microbiol. Lett. **20**:135-139.

2. Böck, A., Wirth, R., Schmid, G., Schumacher, G., Lang, G., and Buckel, P. 1983. The two subunits of penicillin acylase are processed from a common precursor. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**:141-144.
3. Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, J., Moody, P.C.E., Smith, J.L., Tomchick, D.R., and Murzin, A.G. 1995. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* **378**:416-419.
4. Burtscher, H., and Schumacher, G. 1992. Reconstitution *in vivo* of penicillin G acylase activity from separately expressed subunits. *Eur. J. Biochem.* **205**:77-83.
5. Choi, K.S., Kim, J.A., and Kang, H.S. 1992. Effects of site-directed mutations on processing and activities of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. *J. Bacteriol.* **174**:6270-6276.
6. Connors, T.A. 1995. The choice of prodrugs for gene directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Gene Ther.* **2**:702-709.
7. Daumy, G., Danley, D., and McColl, A.S. 1985. Role of protein subunits in *Proteus rettgeri* penicillin G acylase. *J. Bacteriol.* **163**:1279-1281.
8. Galipeau, J., Li, H., Paquin, A., Sicilia, F., Karpati, G., and Nalbantoglu, J. 1999. Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective *in vivo* suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Cancer Res.* **59**:2384-2394.
9. Gumpert, J., Cron, H., Plapp, R., Niersbach, H., and Hoischen, C. 1996. Synthesis and secretion of recombinant penicillin G acylase in bacterial L-forms. *J Basic Microbiol.* **36**:89-98.

10. Kozak, M. 1996. Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm. Genome* **7**:563-574.
11. Lee, H., Park, O.K., and Kang, H.S. 2000. Identification of a new site for autocatalytic processing of penicillin acylase precursor in *Escherichia coli* ATCC11105. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**:199-204.
12. Morgenstern, J.P., and Land, H. 1990. A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res.* **18**:1068.
13. Oh, S., Kim, T., Park, Y., Min, S., Kim, I., and Kang, H. 1987. Complete nucleotide sequence of the penicillin G acylase gene and the flanking regions, and its expression in *Escherichia coli*. *Gene* **56**:87-97.
14. Ory, D.S., Neugeboren, B.A., and Mulligan, R.C. 1996. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11400-11406.
15. Robas, N., Zouheiry, H., Branlant, G., and Branlant, C. 1993. Improved penicillin amidase production using a genetically engineered mutant of *Escherichia coli* ATCC 11105. *Biotechnol. Bioeng.* **41**:14-24.
16. Salmon, S.E., and Sartorelli, A.C. 1998. Cancer chemotherapy, pp.881-915. *In* B.G. Katzung (ed), *Basic and Clinical Pharmacology*, 7th ed. Appleton & Lange, Stamford, CT.
17. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Electrophoretic separation of proteins; detection of proteins, pp.10.7-10.35. *In* Chris Nolan (ed), *Molecular*

- Cloning. A Laboratory Manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, NY.
18. Schumacher, G., Sizmann, D. Haug, H., Buckel, P., and Böck, A. 1986. Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene - protein relation. *Nucleic Acids Res.* **14**:5713-5727.
 19. Sizmann, D., Keilmann, C., and Böck, A. 1990. Primary structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. *Eur. J. Biochem.* **192**:143-151.
 20. Skehan, P., Storeng, R., Sudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**:1107-1112.
 21. Sriubolmas, N., Panbangred, W., Sriurairatana, S., and Meevootisom, V. 1997. Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**:373-378.
 22. Valle, F., Babas, P. Merino, E., and Bolivar, F. 1991. The role of penicillin amidases in nature and in industry. *Trends Biochem. Sci.* **16**:36-40.
 23. Verhaert, R.D., Riemens, A.M., Van Der Laan, J.M., Van Duin, J., and Quax, W.J. 1997. Molecular cloning and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3412-3418.
 24. Virden, R. 1990. Structure, processing and catalytic action of penicillin acylase. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **8**:189-218.

DÉCLARATION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom: Trudeau

Prénom: Caroline

Titre du programme (sigle): Ph.D. Pharmacologie (3-520-1-0).

Faculté: Médecine.

Département: Pharmacologie.

Université: Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

2. Description de l'article

Titre: A Study on the Expression of Penicillin G Amidase in Mammalian Cells.

Auteurs: Caroline Trudeau, Naciba Benlimame, Ala-Eddin Al Moustafa, Jacques Galipeau, Moulay A. Alaoui-Jamali, Prabhat Arya, et Gérald Batist.

Revue: Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

Date: soumis en mars 2002.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Caroline Trudeau inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre «Étude de gènes suicides et de promédicaments pour la thérapie génique du cancer.»

Naciba Benlimame



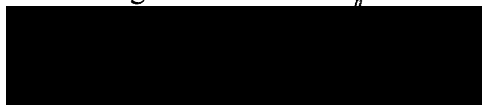
11/3/02

Coauteur

Signature

Date

Ala-Eddin Al Moustafa



11/3/02

Coauteur

Signature

Date

Jacques Galipeau



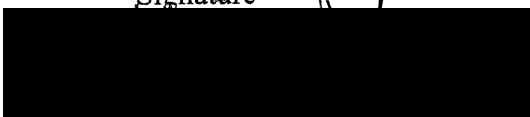
March 11, 2002

Coauteur

Signature

Date

Moulay A. Alaoui-Jamali



11/03/02

Coauteur

Signature

Date

Prabhat Arya



11/03/02

Coauteur

Signature

Date

Gérald Batist



11/03/02

Coauteur

Signature

Date

CHAPITRE 7

**A Novel Parasite-Derived Suicide Gene for Cancer Gene Therapy with Specificity
for Lung Cancer Cells**

**Caroline Trudeau,^{1,2,4} Shala Yuan,^{2,4} Jacques Galipeau,^{3,4} Naciba Benlimame,^{2,4}
Moulay A. Alaoui-Jamali,^{2,4} and Gerald Batist^{1,2,4}**

¹Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7
Canada; ²McGill Centre for Translational Research in Cancer, ³Department of Medicine
(Division of Hematology-Oncology), and ⁴Lady Davis Institute for Medical Research of
the Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital, Montréal, Québec H3T 1E2
Canada.

Article publié dans la revue Human Gene Therapy 12:1673-1680 (2001).

Running title: Parasite Gene in Suicide Gene Therapy.

Correspondence should be directed to: Dr. Gerald Batist, McGill Centre for Translational
Research in Cancer, Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital, Suite D-127, 3755
Côte Ste. Catherine Road, Montréal, Québec, H3T 1E2 Canada; [REDACTED]
Fax: (514) 340-7916; E-mail [REDACTED]

RÉSUMÉ

L'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase exprimée par le parasite *Trypanosoma brucei* (TbHGPRT) peut convertir l'allopurinol, un analogue de purine, en des nucléotides correspondants avec une plus grande efficacité que son homologue humain. Nous avons développé un système rétroviral qui exprime l'enzyme du parasite et nous avons testé sa capacité à activer le promédicament allopurinol en des métabolites cytotoxiques. Des tests de cytotoxicité ont démontré que cinq lignées cellulaires de cancer du poumon non à petites cellules, transduites avec le vecteur rétroviral contenant TbHGPRT, ont été affectées par le promédicament par un facteur de 2,1 à 7,6 fois, par rapport aux contrôles respectifs. Cette sélectivité n'a pas été observée avec sept autres lignées cellulaires cancéreuses exprimant aussi TbHGPRT dont le cancer du sein. Il a été démontré que la cytotoxicité accrue à l'allopurinol était reliée à l'induction de l'apoptose chez les cellules cancéreuses de poumon. La sélectivité de ce gène suicide pour les cellules cancéreuses de poumon n'a pu être expliquée par l'expression de la protéine TbHGPRT, ni par l'accumulation d'allopurinol dans les cellules. Notre étude démontre que ce nouveau système peut devenir un outil thérapeutique utile pour la thérapie génique du cancer du poumon, en tenant compte que l'allopurinol est une drogue bien tolérée par les humains.

ABSTRACT

The enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase expressed by the parasite *Trypanosoma brucei* (TbHGPRT) can convert allopurinol, a purine analogue, to corresponding nucleotides with greater efficiency than its human homologue. We have developed a retroviral system that expresses the parasitic enzyme and we tested its capacity to activate the prodrug allopurinol to a cytotoxic metabolite. Cytotoxicity assays demonstrated that five non-small cell lung carcinoma cell lines transduced with the construct, were sensitized to the prodrug by a 2.1 to 7.6- fold compared to controls. This selectivity was not observed in seven other cell lines also expressing the construct, such as breast carcinoma. Assays indicated that enhanced cytotoxicity to allopurinol correlated with induction of apoptosis in lung cancer cells. The selectivity of this suicide gene was not explained either by the TbHGPRT expression or by the allopurinol accumulation. Our study shows that this novel system may represent a therapeutic tool for gene-prodrug targeting of lung cancer, considering the fact that allopurinol is well tolerated in humans.

INTRODUCTION

Although chemotherapy is the major treatment for the management of several types of cancer, the chemotherapeutic agents that are currently used in the clinic are limited by their narrow therapeutic index, limited selectivity and severe side effects, and common occurrence of drug resistance. In order to selectively target cancer cells, the use of non toxic prodrugs that are converted into pharmacologically active compounds by a gene introduced intracellularly, and normally not expressed in the cell environment, is an attractive alternative offered by gene therapy. Several enzyme/prodrug activation systems have been developed, including the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir, the *E.coli* cytosine deaminase/5-fluorocytosine, and the rat CYP2B1/cyclophosphamide combination (Chen and Waxman, 1995; Deonarain *et al.*, 1995).

The focus of our study is to examine the potential application of a *Trypanosoma brucei* (Tb) derived gene that encodes the enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT). Tb is a protozoan parasite that causes African sleeping sickness. As opposed to mammals that synthesize purine nucleotides *de novo*, parasites such as Tb are incapable of such a metabolism and must obtain purines from their host (Allen and Ullman, 1993; Balana-Fouce *et al.*, 1998; Katzung and Furst, 1998). The TbHGPRT enzyme has been purified and has a substrate affinity for the prodrug allopurinol, a purine analogue and an isomer of hypoxanthine. Allopurinol is widely used for the treatment of gout (Allen and Ullman, 1993; Katzung and Furst, 1998). Previous studies have shown that the parasitic HGPRT can convert allopurinol to corresponding nucleotides that are metabolized to triphosphates, which then are

incorporated into RNA resulting in inhibition of protein synthesis and the parasite death (Fish *et al.*, 1985; Azas *et al.*, 1997). This has provided the rationale for the successful use of allopurinol to treat trypanosomiasis.

As allopurinol is an extremely poor substrate for the mammalian HGPRT (Katzung and Furst, 1998), we have developed a retroviral system to express TbHGPRT cDNA and we tested its potential to activate allopurinol to a cytotoxic metabolite. We have demonstrated that some cancer cells modified to express TbHGPRT acquire the ability to convert the non toxic allopurinol to cytotoxic metabolites that are selective inducers of apoptosis in lung cancer cells. The reason for its selective efficacy is unknown, but also represents an important clue to optimizing this system for therapeutic use. To our knowledge, this is the first suicide gene to be derived from a parasite. Our data support the development of the TbHGPRT/allopurinol system as a potential therapeutic tool for gene therapy of lung cancer.

MATERIALS AND METHODS

Cells and cell culture. The human neuroblastoma cell line IMR32 (obtained from the American Type Culture Collection [ATCC], Rockville, MD) was grown in basic medium, also referred to as proliferating medium, which contains Eagle's minimal essential medium, 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 1% nucleosides, 1% glutamine, 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), and 1% penicillin-streptomycin (PS). The human non-small cell lung carcinomas H460 and H661, the mouse Lewis lung carcinoma M27, the human bronchio-alveolar carcinoma H322, the human squamous cell lung carcinoma H520, and the human breast carcinoma cell lines

MCF7, MDA231, and ZR75 (ATCC) were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% heat inactivated FBS and 1% PS. The human lung carcinoma cell line A549 (ATCC) was maintained in DMEM supplemented with 10% heat inactivated FBS and 1% PS. The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 (ATCC) was maintained in Alpha Modification of Eagle's brand supplemented with 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 1% nucleosides, 1% glutamine, 10% heat inactivated FBS, 1% PS, and 0,1% gentamycin. The mouse mammary carcinoma cell line DA3 (ATCC) was maintained in RPMI 1640 supplemented with 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, 1% nucleosides, 1% glutamine, 10% heat inactivated FBS, and 1% PS. The human embryonic kidney 293GPG retroviral packaging cell line (Ory *et al.*, 1996), kindly provided by R.C. Mulligan (Children's Hospital, Boston, MA) was maintained in 293 media: DMEM supplemented with 10% heat inactivated FBS, 0.3 mg/ml neomycin, 2 µg/ml puromycin, 1µg/ml tetracycline, and 1% PS. All cell lines were maintained at 37°C under 5% CO₂.

Construct design. pTbiGFP was constructed by inserting the coding region of the HGPRT gene into the multiple cloning site of AP2 (Galipeau *et al.*, 1999), a bicistronic, nonsplicing murine retroviral vector that expresses an enhanced green fluorescent protein (EGFP). The 770 bp cDNA was excised by a NdeI partial digest (blunted) and SalI digest of the pBAce vector (Craig *et al.*, 1991), a generous gift from B.Ullman (Oregon Health Sciences University, Portland, OR), and was ligated into the BglIII (blunted)-XhoI-cut AP2 vector to generate pTbiGFP (Fig. 7.1A, p. 110). Restriction and cloning enzymes were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC, Canada).

Production of retroviral particles containing TbHGPRT constructs.

Recombined vesicular stomatitis virus G (VSVG) pseudotyped retroparticles were generated by stable transfection of the 293GPG packaging cell line (Ory *et al.*, 1996). Stable transfection was done by cotransfection of 2 µg of FspI linearized retrovector construct and 1:25 ratio of pJ6ΩBleo plasmid (Morgenstern and Land, 1990). Transfected cells were subsequently selected in 293GPG media supplemented with 100 µg/ml zeocin (Invitrogen, San Diego, CA). Resulting stable producer populations were used to generate virus. All viral supernatants were filtered with 0.45 µm syringe-mounted filters (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) and stored at -80°C. Concentration of VSVG retroparticles was done as previously described (Galipeau *et al.*, 1999).

Transduction of cancer cells and flow cytometry. The cell lines mentioned below were plated at a density of 2×10^4 cells per well in a 6-well plate (Costar, Cambridge, MA) and incubated for 24 hours at 37°C under 5% CO₂. The medium was removed and replaced with one ml of growth medium and concentrated viral supernatant (titers of 1.67×10^6 cfu/ml and 2.28×10^9 cfu/ml, for TbHGPRT and AP2, respectively). Polybrene (Sigma, St.Louis, MO) was added to a final concentration of 6 µg/ml. This procedure was repeated for at least 3 consecutive days. Stable transduced cells were expanded and mixed populations of transduced cells were used for all the experiments. Flow cytometry (Epics XL/MCL Coulter analyzer, Beckman Coulter, Miami, FL) was performed within one week after transduction to ascertain retrovector expression and gene transfer efficiency as measured by the EGFP fluorescence.

Western blotting for TbHGPRT protein. To demonstrate the expression of the protein in transduced cell lines, a rabbit polyclonal antibody against TbHGPRT (a

generous gift from B.Ullman) was used at a dilution of 1:2000. Extracts from *E.coli* induced to overexpress a construct containing TbHGPRT were used as a positive control to visualize the protein (a gift from B.Ullman). Equal protein amounts were electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes as described (Sambrook *et al.*, 1989). Proteins were visualized with the ECL immunodetection system (Amersham Pharmacia Biotech). The mouse monoclonal anti-actin antibody (clone C4) that was used as an internal control is from Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada). The densitometry of the TbHGPRT and actin bands on the Western blot of the prodrug sensitized cell lines was determined with the NIH Image software and a UMAX Super Vista scanner.

Immunofluorescence Microscopy. Stably transduced A549 cells were plated on coverslips at a density of 5×10^4 cells per well. After 2 days, the cells were gently washed with phosphate buffer saline (PBS) and fixed with paraformaldehyde 3% (w/v) for 5 min, followed by precooled methanol (-20°C) for 15 min. The cells were then washed several times with PBS and incubated for 1h with a mixture of blocking solution containing 2% bovine serum albumine (BSA), 2% normal goat serum, and 0.2% gelatin in PBS at room temperature to reduce non-specific binding. The cells were then incubated with the primary antibody (rabbit polyclonal against TbHGPRT at 1:500) for 1 h at room temperature. After several washes with PBS supplemented with BSA 0.2%, the cells were incubated with an appropriate secondary antibody conjugated to Texas Red at 1:1000 (Jackson Laboratories, West Grove, PA) for 30 min. The coverslips were mounted with Airvol (Air Products and Chemicals, Allentown, PA) and analyzed with a

Zeiss LSM 410 inverted confocal microscope (Institut Universitaire de Gériatrie de Montréal, Montréal, QC, Canada).

Cytotoxicity assay. The cytotoxic effect of allopurinol was determined using a sensitive colorimetric assay that measures the protein content of viable cells (Skehan *et al.*, 1990). Stably transduced cells with pTbiGFP or AP2 (empty retrovector), were plated in 100 μ l of medium at a density of 2×10^3 cells per well in 96-well plates (Costar). Plates were then incubated for 24 hours at 37°C under 5% CO₂. One hundred μ l of fresh culture medium containing allopurinol (Sigma), was added to achieve a range of concentrations from 10 to 800 μ g/ml. Cells were incubated for an additional 3 days and the sulforhodamine B (SRB) (Sigma) assay was carried out as described (Skehan *et al.*, 1990). The absorbance was measured at 490 nm with a universal microplate reader ELx800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). The same experimental procedure was performed with 6-thioguanine (Sigma), at a concentration range of 0.1 to 60 μ M. Experiments were repeated at least three times, in triplicate. Differences were considered significant at $P \leq 0.05$ using the Student *t* test, when IC₅₀ values are compared between the pTbiGFP or AP2 transduced cells treated with allopurinol.

Apoptotic cell death assay. For this assay, 3.5×10^5 stably transduced A549 cells were plated in Falcon 100x20 mm dishes (Becton-Dickinson, Franklin Lanes, NJ) and incubated for 24 hours at 37°C under 5% CO₂. Fresh culture medium containing allopurinol was added to achieve a range of concentrations of 0, 25, 50, or 100 μ g/ml, and cells were incubated for 3 days. The samples were prepared by using a TUNEL reaction-based *in situ* cell death detection kit, according to the manufacturer's protocol (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Specific detection and quantification of apoptosis

versus necrosis, was based on the preferential labeling of induced DNA strand breaks of fixed cells with fluorescein dUTP. Flow cytometry was performed and between 3,000 to 20,000 individual cells were counted for each sample, in duplicate. The assay was repeated three times.

Prodrug uptake assay. A549, H322, and DA3, stably transduced cell lines, were plated at a density of 15×10^4 cells per well in a 24-well plate (Costar) in duplicate, and incubated for 24 hours at 37°C under 5% CO₂. The medium was removed and replaced with fresh growth medium containing 0.5 µg/ml (1,900 µCi/µmole in 500 µl medium) [³H] allopurinol (Moravek Biochemicals, Brea, CA). After time exposure of 5 min, 30 min, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, and 72 h, the cells were collected, washed and resuspended in 50 µl of PBS. The cell suspensions were then freeze-thawed rapidly three times and centrifuged to obtain the cytosolic extract (supernatant). Equal amount aliquots of the samples were used to quantitate the [³H] content with a liquid scintillation counter Wallac 1409 (PerkinElmer Wallac, St.Laurent, QC, Canada), and to determine the spectrophotometric concentration of protein (Bradford assay). The uptake assay was repeated twice.

RESULTS AND DISCUSSION

We have generated a novel suicide gene/prodrug system, consisting of a bicistronic retroviral vector that expresses our gene of interest TbHGPRT and the EGFP marker (Fig. 7.1A, p. 110). Using EGFP fluorescence as a measure of gene transfer efficiency, we achieved a high expression in polyclonal population of cells (>80% EGFP positive; data not shown). The expression of the TbHGPRT protein was confirmed by Western blot, in a panel of cancer cell lines derived from lung (Fig. 7.1B, p. 111) and breast carcinomas (Fig. 7.1C, p. 111). Furthermore, immunofluorescence microscopy revealed that the cellular localization of the TbHGPRT protein is diffuse in the cytoplasm (Fig. 7.2B, p. 112) as opposed to control cells transduced with the empty retrovector where no specific expression was observed (Fig. 7.2A, p. 112).

In non transduced cells, allopurinol is devoid of cytotoxicity in all cell lines tested. Interestingly, cancer cells modified to express the parasite TbHGPRT gene were sensitized to the non toxic doses of the purine analogue allopurinol. This suicide effect was observed specifically in one murine lung cancer cell line (M27), and four human non-small cell lung carcinoma cell lines (A549, H460, H661, H520), but not in a bronchio-alveolar carcinoma cell line (H322). Interestingly, TbHGPRT gene-mediated allopurinol toxicity was not observed in a mouse mammary tumor cell line (DA3), three human breast carcinoma cell lines (MCF7, MDA231, ZR75), as well as in a human hepatocellular carcinoma (HepG2), and a human neuroblastoma (IMR32). As indicated in Table 7.1 (p. 113), comparison between allopurinol concentrations that inhibit cell growth by 50% (IC_{50}), revealed that TbHGPRT transduced-lung cancer cells were more

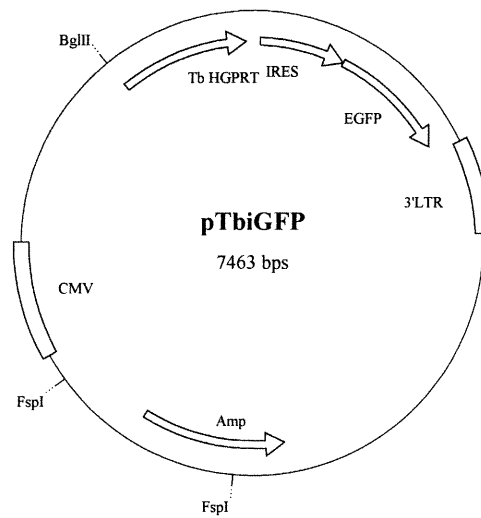


FIG. 7.1 (A) Schematic representation of the pTbiGFP construct. Amp, ampicillin resistance gene; CMV, cytomegalovirus promoter element; EGFP, enhanced green fluorescent protein; IRES, internal ribosomal entry site; LTR, long terminal repeat; BglII and FspI, restriction sites used in construct design or linearization of retrovector.

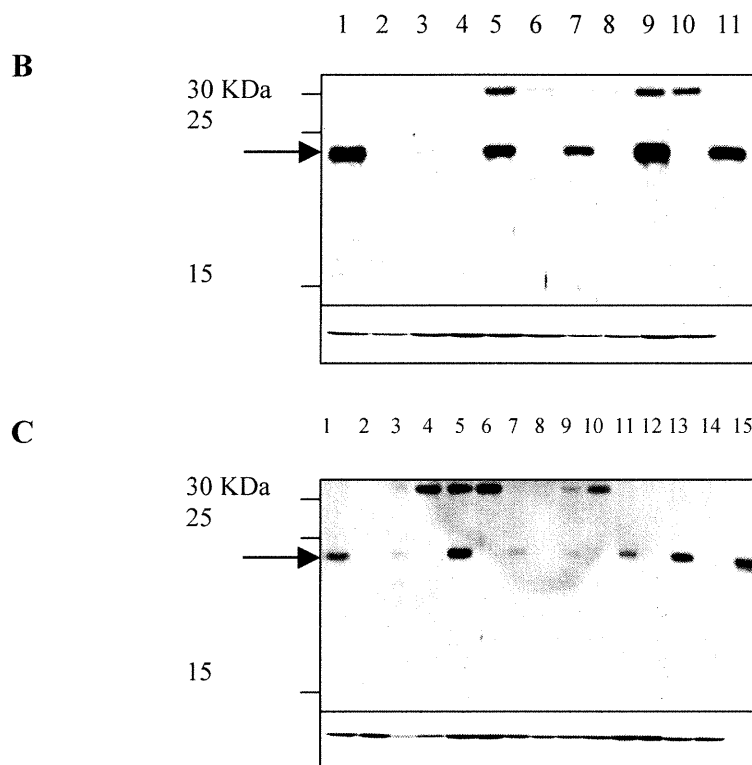


FIG. 7.1 (B and C) Western blot analysis of TbHGPRT protein expression in cells transduced with the pTbiGFP construct (designated below as Tb) *versus* the empty vector (AP2) transduced cells. The arrow shows a distinct band below the 25kDa ladder that corresponds to the expected size of TbHGPRT (mol. mass = 23.4 kDa, according to Allen and Ullman, 1993). Actin was detected as an internal control. **(B)** Extracts from the cell lines that showed a cytotoxic effect after exposure to allopurinol: 1, M27Tb; 2, M27AP2; 3, H661Tb; 4, H661AP2; 5, H460Tb; 6, H460AP2; 7, H520Tb; 8, H520AP2; 9, A549Tb; 10, A549AP2; 11, induced *E.coli* overexpressing a TbHGPRT construct. **(C)** Extracts from the cell lines that showed no sensitization after exposure to allopurinol: 1, IMR32Tb; 2, IMR32AP2; 3, HepG2Tb; 4, HepG2AP2; 5, H322Tb; 6, H322AP2; 7, MCF7Tb; 8, MCF7AP2; 9, ZR75Tb; 10, ZR75AP2; 11, MDA231Tb; 12, MDA231AP2; 13, DA3Tb; 14, DA3AP2; 15, induced *E.coli* overexpressing a TbHGPRT construct.

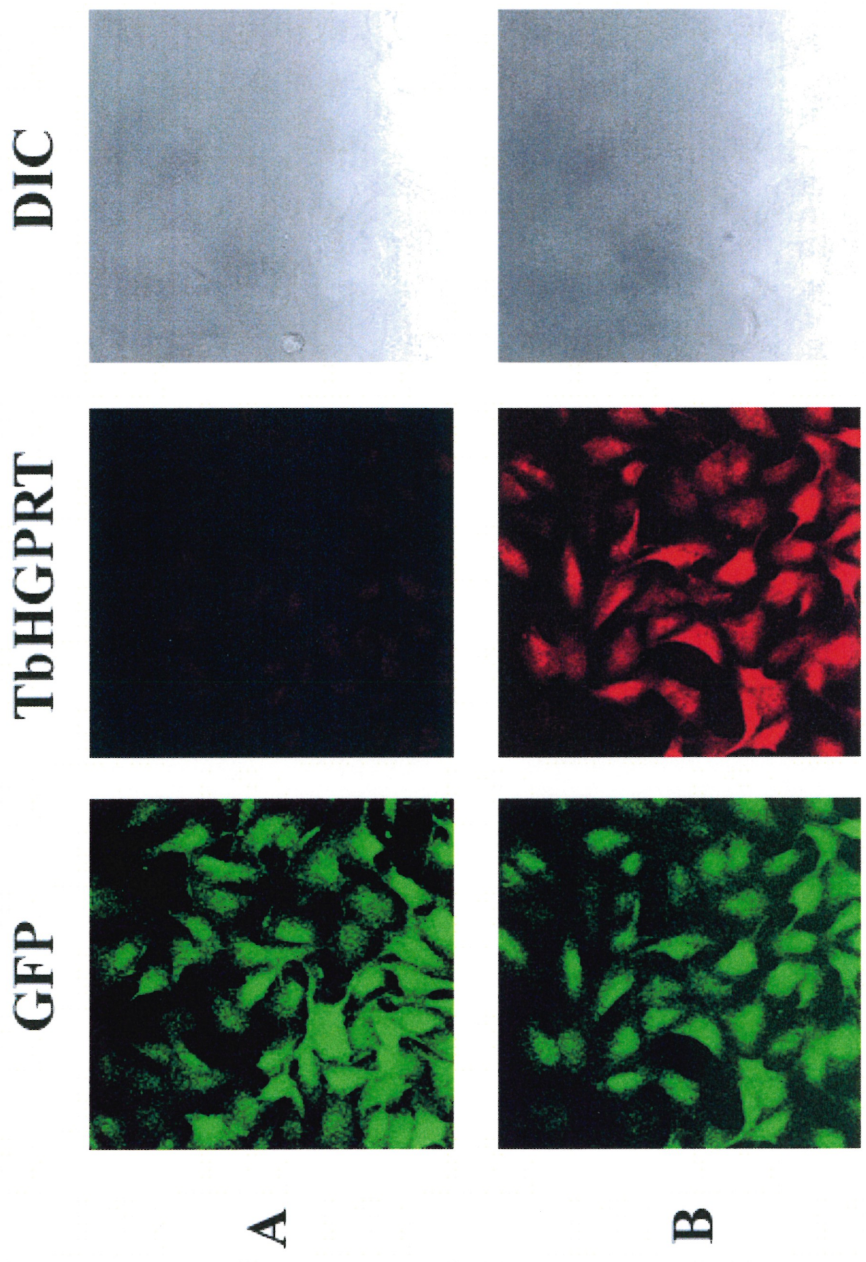


Figure 7.2 Diffuse cytoplasmic localization of the TbHGPRT protein (in red) after the A549 cells were prepared for immunocytochemistry. Shown are stably transduced cells with the empty vector (AP2) (**A**) or the construct containing TbHGPRT (**B**). DIC, differential interference channel.

sensitive to allopurinol than control cells transduced with the empty retroviral vector (AP2).

TABLE 7.1 SUMMARY OF ALLOPURINOL MODULATION BY TBHGPRT ON DIFFERENT CELL LINES

Cell line	Sensitization to allopurinol ^a	IC ₅₀ AP2 (TbHGPRT-) ^b	IC ₅₀ TbHGPRT ^b	Fold-sensitization to allopurinol
A549	+	501 (75)	66 (10)	7.6
H460	+	159 (41)	22 (2)	7.2
H520	+	208 (45)	41 (6)	5.1
M27	+	252 (22)	56 (8)	4.5
H661	+	434 (116)	211 (87)	2.1
H322	-	606 (42)	682 (37)	
DA3	-	764 (63)	764 (27)	
ZR75	-	764 (11)	635 (21)	
MDA231	-	294 (30)	310 (56)	
MCF7	-	433	604	
HepG2	-	106 (21)	225 (11)	
IMR32	-	713 (26)	726 (22)	

^a + represents a cytotoxic effect with allopurinol incubation; - represents the absence of toxicity. There was a significant difference between the IC₅₀ values of the TbHGPRT transduced cells and their IC₅₀ controls (AP2) for the + cell lines (A549: P=0.004; M27: P=0.0003; H460: P=0.05; H520: P=0.01; H661: P=0.02, by Student's *t* test).

^b The IC₅₀ corresponds to the concentration of allopurinol in µg/ml at which 50% of cells are killed for each cell line. Numbers in parentheses correspond to the SE of at least three independent experiments, with the exception of MCF7 which was done once. The IC₅₀ was determined by the SRB assay, as described in Materials and Methods.

As indicated in Figure 7.3A, B, and C (p. 115), comparison between IC_{50} values reveals that non-small cell lung cancer cell lines A549, M27, and H460 are 7.6-, 4.5-, and 7.2-fold more sensitive to allopurinol, compared to their respective control cells. Non-small cell lung cancer cell lines H520 and H661 are 5.1- and 2.1-fold more sensitive to allopurinol. Figure 7.3D, E, and F (p. 116), show typical survival curves of three breast cancer cell lines DA3, ZR75, and MDA231, respectively, that were not sensitized to the prodrug.

A Pearson correlation test was established between the above-mentioned fold changes in cell susceptibility to allopurinol, and the relative density of the TbHGPRT band to actin (data not shown) on the Western blot of the five lung cancer cell lines sensitized to allopurinol (Fig. 7.1B, p. 111). The test demonstrated that there is no correlation between the fold changes and the expression of the TbHGPRT-transduced sensitized cell lines ($P=0.371$). Also, TbHGPRT was highly expressed in cancer cell lines other than lung, although the cells were not sensitized to allopurinol.

The prodrug uptake assay does not explain the sensitization of the lung cancer cells, nor the lack of sensitization in one of the six lung cancer-derived lines (H322). The TbHGPRT-transduced A549 sensitized cells do not show a higher accumulation of [3 H] allopurinol than the two other tested TbHGPRT-transduced cell lines, H322 and DA3, which are not sensitized to allopurinol. H322 cells showed a higher uptake than A549 at all the time exposures, and DA3 also showed a higher uptake for 1 h, 6 h, and 12 h (Fig. 7.4, p. 117). Therefore, neither expression of the TbHGPRT gene, nor cellular accumulation of the prodrug could account for the differences in cytotoxicity observed between the cell lines tested.

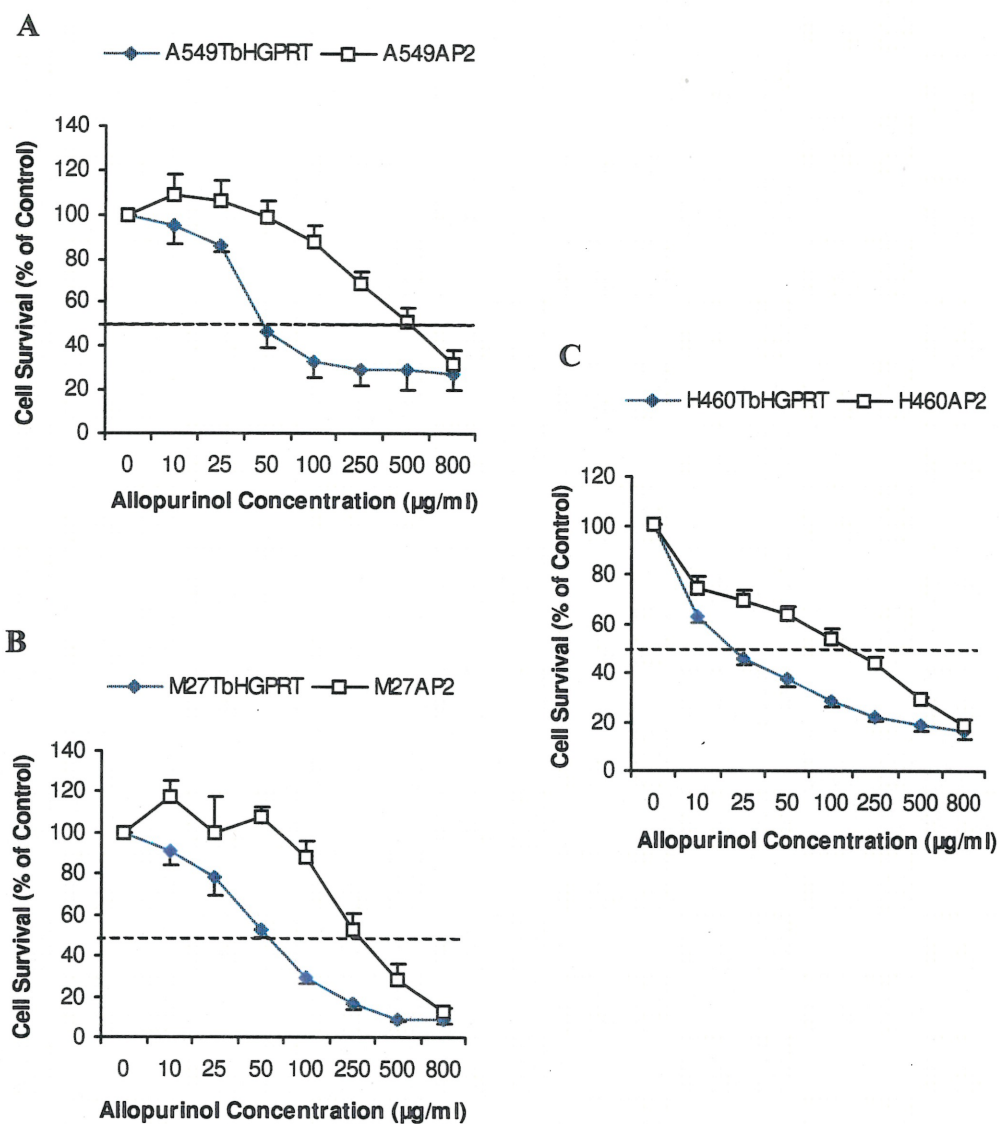


FIG. 7.3 Cell survival after treatment with allopurinol (incubation of 72 hr). Cells were stably transduced with either the empty retrovector (AP2) or the construct containing TbHGPRT. (A-C) Curves for three cell lines, A549, M27, and H460, respectively, that show a decrease in cell survival after exposure to the prodrug. Data points indicate mean survival measured in at least three independent experiments; bars indicate SE.

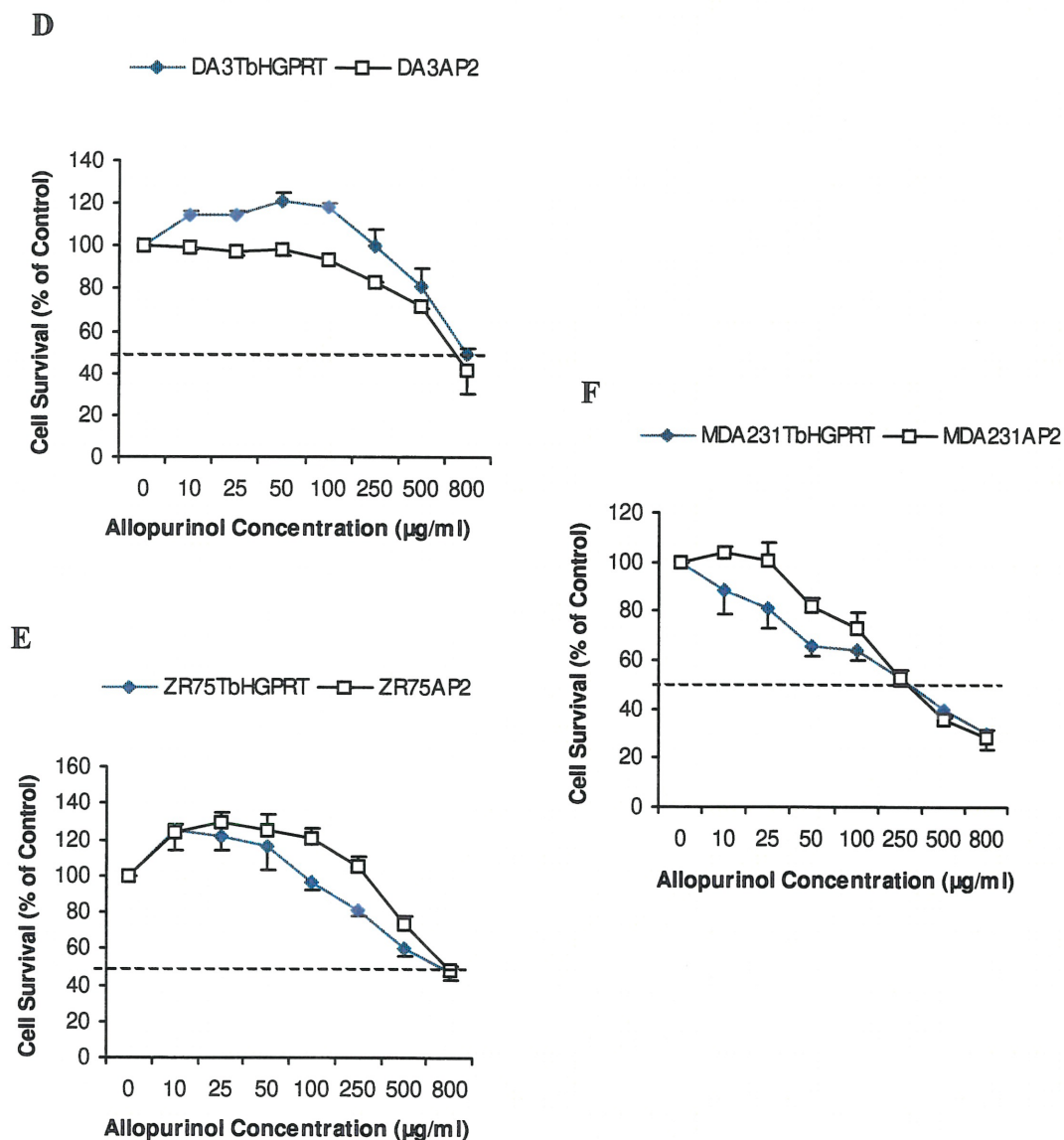


FIG. 7.3 Cell survival after treatment with allopurinol (incubation of 72 hr). Cells were stably transduced with either the empty retrovector (AP2) or the construct containing TbHGPRT. **(D-F)** Curves for three cell lines, DA3, ZR75, and MDA231, respectively, that do not show any sensitization to the prodrug. Data points indicate mean survival measured in at least three independent experiments; bars indicate SE.

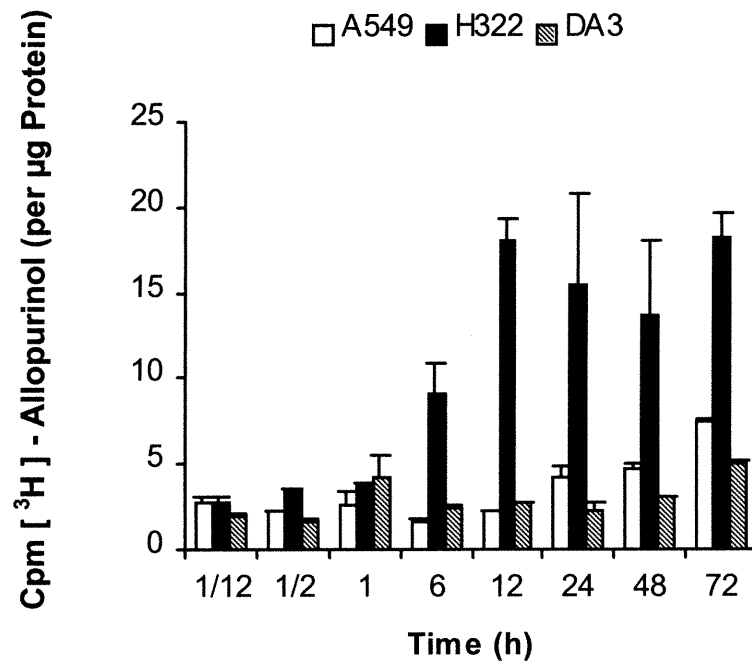


FIG. 7.4 [³H]Allopurinol uptake by A549, H322, and DA3 cells transduced with TbHGPRT. Cpm, counts per minute. Cells were incubated with [³H]allopurinol (1,900 μCi/μmole) at the indicated time and prepared as described in Materials and Methods. The cell uptake is the result of two independent experiments done in duplicate. Bars indicate SE.

The results of the TUNEL assay indicate that TbHGPRT/allopurinol is cytotoxic by induction of apoptosis (Fig. 7.5, p. 119). The differences between the number of apoptotic cells for the TbHGPRT-transduced cells and their controls were significant. TbHGPRT-transduced A549 cells show 55.33% of apoptotic cells *versus* 0.30% for control AP2 cells, at 50 $\mu\text{g/ml}$ allopurinol, compared to 75.80% *versus* 0.21%, respectively, at 100 $\mu\text{g/ml}$ allopurinol.

In several parasites such as Tb, the HGPRT enzyme converts hypoxanthine and guanine bases into inosine monophosphate (IMP) or guanosine monophosphate (GMP). HGPRT catalyzes the transformation of hypoxanthine or guanine with 5'phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP), to the corresponding nucleoside monophosphates, IMP or GMP. Although TbHGPRT prefers natural bases such as hypoxanthine and guanine, it is also capable of phosphoribosylating allopurinol, an isomer of hypoxanthine, into its ribonucleoside 5'monophosphate HPPR-MP (4-hydroxypyrazolo [3,4-*d*] pyrimidine ribonucleoside), which is an IMP analogue (Spector *et al.*, 1982, 1984; Allen and Ullman, 1993). HPPR-MP is then further converted to APPR-MP (4-aminopyrazolo [3,4-*d*] pyrimidine ribonucleotide), an isomer of adenosine monophosphate, via the adenylosuccinate synthetase and the adenylosuccinate lyase enzymes. APPR-MP is consequently metabolized into triphosphates and incorporated in the parasite RNA, leading to the inhibition of the RNA replication chain (Spector *et al.*, 1982, 1984). These reactions using allopurinol have made this drug a safe and effective anti-parasitic therapy in humans, since allopurinol is a poor substrate for the mammalian HGPRT. Indeed, it has been shown that the human HGPRT catalyzes the phosphoribosylation of

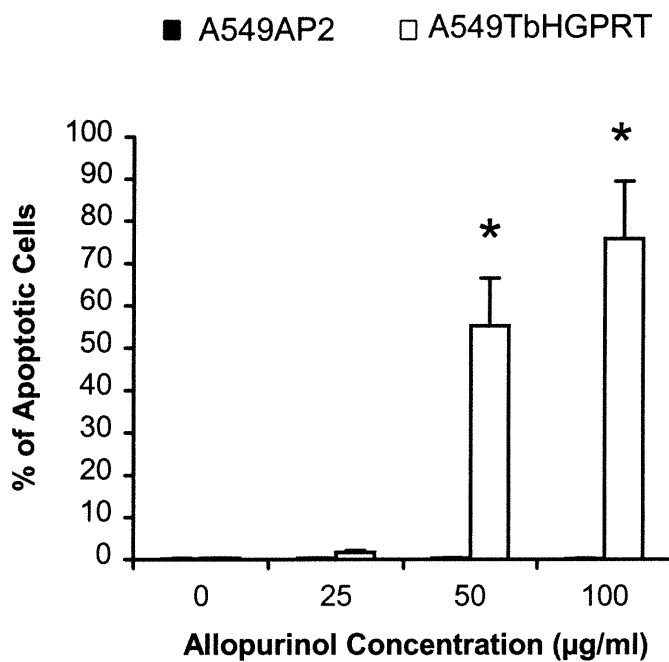


FIG. 7.5 Apoptosis induction by allopurinol on A549 cells transduced with either TbHGPRT or the empty vector (AP2). The percentage of apoptotic cells is the result of three independent experiments done in duplicate. Bars indicate SE. *Significantly different from control (50 µg/ml: $P=0.05$; 100 µg/ml: $P=0.04$, by Student's *t* test).

allopurinol at only 10% the efficiency of the *Leishmania donovani* enzyme, another member of the *Trypanosomatidae* family (Tuttle and Krenitsky, 1980).

Although it has been reported that the level of the adenylosuccinate synthetase enzyme is higher in some human tumors (Jackson *et al.*, 1975), studies on parasites have shown that HPPR-MP is not an efficient substrate for the mammalian adenylosuccinate synthetase enzyme, and therefore, APPR-MP could not be detected in mammalian tissues (Spector and Miller, 1976; Marr and Berens, 1983). Therefore, the metabolic pathway leading to toxicity in parasites might not be represented in mammalian cells, enzymatic studies of tissues and of the mammalian enzymes demonstrate enough difference to make use of the parasitic enzyme as a selective therapeutic tool. The TbHGPRT enzyme is different from the human HGPRT in its structure and substrate specificity, having only 21% amino acid sequence identity, while it has more homology to a prokaryote (36% identity with *Vibrio harveyi*) (Allen and Ullman, 1993). The unique substrate specificity of the TbHGPRT enzyme has suggested that it may serve as a target for an antiparasitic drug. Clinical studies have shown efficacy of allopurinol in the treatment of cutaneous leishmaniasis (Martinez and Marr, 1992). In mammalian tissues, only trace amounts of HPPR-MP have been reported to be generated from allopurinol (Marr and Berens, 1983; Spector *et al.*, 1984). Moreover, allopurinol is a substrate for xanthine oxidase, which catalyzes the conversion of hypoxanthine into xanthine, and from xanthine into uric acid. Allopurinol acts as an effective competitive inhibitor of the hypoxanthine to uric acid reaction and thus is widely used for the treatment of gout.

The present study establishes a new concept for the use of parasitic enzymes for selective activation of prodrugs in mammalian cells. The selectivity of the activation of allopurinol by the TbHGPRT enzyme has been verified using the purine analogue thioguanine (6-TG). 6-TG, which is a chemotherapeutic agent in clinical use, is first metabolized by the human HGPRT to its nucleotide form, to subsequently interfere with the formation of DNA and RNA metabolism (Katzung and Furst, 1998). In contrast to allopurinol, our cytotoxicity assay performed on A549 cells demonstrated that there was no activation by the enzyme TbHGPRT as revealed by the lack of any differences between the IC₅₀ values of the TbHGRT transduced cells and their controls (data not shown). Although the degree of sensitization to allopurinol was modest (2- to 8- fold), such differences are significant, highly reproducible, and may have a therapeutic implication given the narrow therapeutic index for most standard chemotherapy drugs. Furthermore, this differential selectivity will provide a basis to further improve and optimize prodrug based suicide gene therapy by the use of other allopurinol derivatives or other parasitic enzymes.

Our *in vitro* data suggests that allopurinol doses that can achieve plasma concentrations in the range of 1 mg/ml would be required for the efficacy of this approach. The feasibility of using high doses has been reported in animal studies and in some clinical investigations with allopurinol (Hornbeck *et al.*, 1982; Woolley *et al.*, 1985; Ahmann *et al.*, 1986; Medical Economics, 2001). Although this lies beyond the scope of our study, it may well be important to achieve high plasma drug concentrations, which may require novel approaches, including the use of allopurinol encapsulated liposomes or the design of analogues that have distinct pharmacodistribution/kinetics of

clearance. On the other hand, in the *in vivo* situation, the concentration of drug achieved at the tissue level may be different. Ongoing studies in animal models will help to address these issues in order to optimize the utility of this prodrug-based gene therapy for cancer.

We cannot at this point explain the apparent selectivity of this suicide gene effect in non-small cell lung cancer cells compared to other types of cells, including a bronchio-alveolar cell line. We can speculate on several possibilities, including inherent cellular susceptibility to TbHGPRT function, and differences in cellular potential to repair DNA lesions caused by this exogenous nucleotide (Karran and Bignami, 1996; Swann *et al.*, 1996), or variation in other drug metabolism regulatory factors. While additional molecular studies are required to explore the differential activity of TbHGPRT, our study provides basic data supporting the development of this family of genes as a promising tool to target lung cancer cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful for Dr. Buddy Ullman's (Oregon Health Sciences University, Portland, OR) generous gift of the TbHGPRT cDNA and polyclonal antibody. We are very thankful to Michel Lamoureux (Dept. of Mathematics and Statistics, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada), for his valuable assistance in the statistical analysis of the data.

This work was supported in part by grants from the Canadian Breast Cancer Research Initiative, the National Cancer Institute of Canada, and the Natural Science and Engineering Research Council of Canada. C.T. is supported by studentships from la Faculté des Études Supérieures, Université de Montréal (Montréal, QC, Canada).

REFERENCES

- AHMANN, F.R., GAREWAL, H., and GREENBERG, B.R. (1986). Phase II trial of high-dose continuous infusion 5-fluorouracil with allopurinol modulation in colon cancer. *Oncology*. **43**, 83-85
- ALLEN, T.E. and ULLMAN, B. (1993). Cloning and expression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene from *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5431-5438.
- AZAS, N., DI GIORGIO, C., DELMAS, F., GASQUEST, M., and TIMON-DAVID, P. (1997). *Leishmania infantum* promastigotes: flow cytometry as a possible tool for assembling the effects of drugs on cellular functions. *Exp. Parasitol.* **87**, 1-7.
- BALANA-FOUCE, R., REGUERA, R.M., CUBRIA, J.C., and ORDONEZ, D. (1998). The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharmacol.* **30**, 435-443.
- CHEN, L., and WAXMAN, D.J. (1995). Intratumoral activation and enhanced chemotherapeutic effect of oxazaphosphorines following cytochrome P-450 gene transfer: development of a combined chemotherapy/cancer gene therapy strategy. *Cancer Res.* **55**, 581-589.
- CRAIG, S.P.III, YUAN, L., KUNTZ, D.A., MCKEROOW, J.H., and WANG, C.C. (1991). High level expression in *Escherichia coli* of soluble, enzymatically active schistosomal hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase and trypanosomal ornithine decarboxylase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 2500-2504.
- DEONARAIN, M.P., SPOONER, R.A., and EPENETOS, A.A. (1995). Genetic delivery of enzymes for cancer therapy. *Gene Ther.* **2**, 235-244.

- FISH, W.R., MARR, J.J., BERENS, R.L., LOOKER, D.L., NELSON, D.J., LAFON, S.W., and BALBER, A.E. (1985). Inosine analogs as chemotherapeutic agents for African trypanosomes: metabolism in trypanosomes and efficacy in tissue culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 33-36.
- GALIPEAU, J., LI, H., PAQUIN, A., SICILIA, F., KARPATI, G., and NALBANTOGLU, J. (1999). Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective *in vivo* suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Cancer Res.* **59**, 2384-2394.
- HORNBECK, C.L., FLOYD, R.A., BYFIELD, J.E., GRIFFITHS, J.C., FRANKEL, S. and SHARP, T.R. (1982). Cerebrospinal fluid versus serum concentrations of 5-FU, allopurinol, and oxipurinol during treatment of metastatic brain cancer with 5-FU infusion, allopurinol, and radiation. *Cancer Treat. Rep.* **66**, 571-573.
- JACKSON, R.C., MORRIS, H.P., and WEBER, G. (1975). Neoplastic transformation-linked alterations in adenylosuccinate synthetase activity. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* **66**, 526-532.
- KARRAN, P., and BIGNAMI, M. (1996). Drug-related killings: a case of mistaken identity. *Chem. Biol.* **3**, 875-879.
- KATZUNG, B.G. and FURST, D.E. (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; Disease-Modifying antirheumatic drugs; Nonopioid analgesics; Drugs used in gout. In *Basic and Clinical Pharmacology*. B.G. Katzung, ed. (Appleton & Lange, Stamford, CT) pp. 578-602.
- MARR, J.J., and BERENS, R.L. (1983). Pyrazolopyrimidine metabolism in the pathogenic trypanosomatidae. *Mol. Biochem. Parasitol.* **7**, 339-356.

- MARTINEZ, S., and MARR, J.J. (1992). Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* **326**, 741-744.
- MEDICAL ECONOMICS. (2001). Aloprim™ (allopurinol sodium). In *Physicians' Desk Reference 55th Edition*. (Medical Economics Company, Montvale, NJ) pp. 2128-2130.
- MORGENSTERN, J.P., and LAND, H. (1990). A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1068.
- ORY, D.S., NEUGEBOREN, B.A., and MULLIGAN, R.C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 11400-11406.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T. (1989). Electrophoretic Separation of Proteins; Detection of Proteins. In *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, NY) pp. 10.7-10.35.
- SKEHAN, P., STORENG, R., SUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., and BOYD, M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112.
- SPECTOR, T., BERENS, R.L., and MARR, J.J. (1982). Adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 225-229.

- SPECTOR, T., JONES, T. E., LAFON, S.W., NELSON, D.J., BERENS, R.L., and MARR, J.J. (1984). Monophosphates of formycin B and allopurinol riboside. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1611-1617.
- SPECTOR, T., and MILLER, R.L. (1976). Mammalian adenylosuccinate synthetase; nucleotide monophosphate substrates and inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 509-517.
- SWANN, P.F., WATERS, T.R., MOULTON, D.C., XU, Y.Z., ZHENG, Q., EDWARDS, M., and MACE, R. (1996). Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* **273**, 1109-1111.
- TUTTLE, J.V., and KRENITSKY, T.A. (1980). Purine phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **255**, 909-916.
- WOOLLEY, P.V., AYOUB, M.J. SMITH, F.P., LOKEY, J.L. DEGREEN, P., MARANTZ, A., and SCHEIN, P.S. (1985). A controlled trial of the effect of 4-hydroxypyrazolopyrimidine (allopurinol) on the toxicity of a single bolus dose of 5-fluorouracil. *J. Clin. Oncol.* **3**, 103-109.

DÉCLARATION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom: Trudeau

Prénom: Caroline

Titre du programme (sigle): Ph.D. Pharmacologie (3-520-1-0).

Faculté: Médecine.

Département: Pharmacologie.

Université: Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

2. Description de l'article

Titre: A Novel Parasite-Derived Suicide Gene for Cancer Gene Therapy with Specificity for Lung Cancer Cells.

Auteurs: Caroline Trudeau, Shala Yuan, Jacques Galipeau, Naciba Benlimame, Moulay A. Alaoui-Jamali, et Gérald Batist.

Revue: Human Gene Therapy, Volume 12, pp.1673-1680.

Date: 1er septembre 2001.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Caroline Trudeau inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre «Étude de gènes suicides et de promédicaments pour la thérapie génique du cancer.»

Shala Yuan



Feb. 14, 2002

Coauteur

Signature

Date

Jacques Galipeau

 (C)

March 11, 2002

Coauteur

Signature

Date

Naciba Benlimame



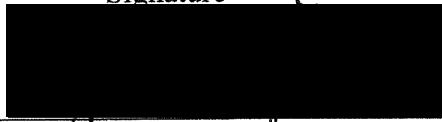
11/3/02

Coauteur

Signature

Date

Moulay A. Alaoui-Jamali



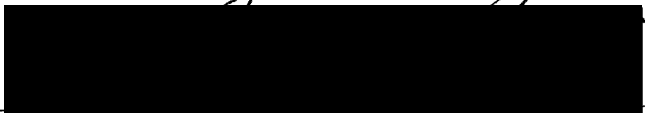
11/03/02

Coauteur

Signature

Date

Gérald Batist



11/03/02

Coauteur

Signature

Date

To: Caroline Trudeau

1455 SHERBROOKE ST. WEST APT. 606
MONTREAL (QUEBEC)
CANADA H3G 1L2
FAX: (514) 933-3473

FAX TRANSMISSION

TO: ESTHER BICOVNY

FAX NO: 9 [REDACTED]

MARY ANN LIEBERT INC. DATE: JAN. 30, 2002

FROM: CAROLINE TRUDEAU

PAGE(S): 1

Dear Ms. Bicovny,

I am a Ph.D. student in Pharmacology at Université de Montréal (Montréal, QC, Canada), and I need a letter from Mary Ann Liebert, Inc. Publishers, that gives me the authorization to include in my thesis the manuscript entitled, «A Novel Parasite-Derived Suicide Gene for Cancer Gene Therapy with Specificity for Lung Cancer Cells», by Caroline Trudeau, Shala Yuan, Jacques Galipeau, Naciba Benlimame, Moulay A. Alaoui-Jamali, and Gerald Batist. It was published in Human Gene Therapy, as of September 1, 2001 (Volume 12: 1673-1680).

I am the first author of this manuscript and the title of my Ph.D. thesis is «Étude de gènes suicides et de promédicaments pour la thérapie génique du cancer» (A Study on Suicide Genes and Prodrugs for Cancer Gene Therapy). This request for an authorization from the editor is part of the requirements of the Faculty of Graduate Studies of Université de Montréal.

Thank you for your cooperation and please do not hesitate to contact me if you need further information. Please send the letter at my abovementioned address.

Sincerely,

[REDACTED]

With pleasure!
Permission Granted

[REDACTED]

Good luck! Much success with your thesis!
Esther

January 30, 2002

CHAPITRE 8

Genomic Cloning of the 5' Region of the Adenylosuccinate Synthetase Gene of
Trypanosoma brucei

Chapitre rédigé sous la forme d'un article (non soumis à une revue scientifique).

RÉSUMÉ

L'adénylosuccinate synthétase (ASS) est une enzyme impliquée dans la synthèse des nucléotides puriques. Chez le parasite *Trypanosoma brucei* (Tb) appartenant à l'ordre *Kinetoplastida*, l'enzyme ASS possède une spécificité de substrat qui est différente de celle de son hôte. Ce facteur représente une cible potentielle pour le développement de nouveaux médicaments et d'un système d'activation de promédicament par une enzyme pour la thérapie génique du cancer. Nous avons cloné et séquencé les 1218 paires de bases de la région 5' du gène TbASS. La séquence partielle peptidique de 406 acides aminés partage 69%, 34% et 27% de résidus en commun avec *Leishmania major*, la levure et l'humain, respectivement. La séquence nucléotidique de la région 5' du gène TbASS démontre une homologie avec certains motifs que l'on retrouve chez d'autres gènes ASS d'origine eucaryotique ou procaryotique, dont une séquence consensus impliquée dans la liaison à la guanosine triphosphate (GTP).

ABSTRACT

The enzyme adenylosuccinate synthetase (ASS) is involved in the synthesis of purine nucleotides. In the protozoan parasite *Trypanosoma brucei* (Tb) of the order *Kinetoplastida*, the ASS enzyme has a substrate specificity that is different from that of its host, which is a potential target for drug development and enzyme prodrug activating systems in cancer gene therapy. We have cloned and sequenced the 1218-base pair of the 5' region of the TbASS gene. The deduced amino acid partial sequence of 406 amino acids shares 69%, 34%, and 27% sequence identity with *Leishmania major*, yeast, and human, respectively. The nucleotide sequence of the 5' region of the TbASS gene reveals some homology with some consensus elements of other eukaryotic or prokaryotic ASS genes, such as a motif involved in GTP (guanosine triphosphate) binding.

INTRODUCTION

Trypanosoma brucei (Tb) is a parasite that causes African sleeping sickness in humans. Metabolic differences between trypanosomes and their hosts are being studied in order to find innovative potential drug targets and therapeutic tools for enzyme prodrug activating systems in cancer gene therapy (Trudeau *et al.*, 2001). An interesting metabolic pathway is the production of purine nucleotides in the *Trypanosomatidae* family. The synthesis of adenosine monophosphate (AMP) and guanosine monophosphate (GMP) proceeds by reactions via inosine monophosphate (IMP) (Fig. 8.1A, p. 137), which involves the strategic role of the adenylosuccinate synthetase (ASS) enzyme (EC 6.3.4.4). Although the pathway for the synthesis of purine nucleotides is similar among organisms, parasites such as Tb differ from their host with regards to two characteristics. First, as opposed to mammals that have the capacity to synthesize purine nucleotides *de novo*, Tb is incapable of such a metabolism and has to obtain purines from its host (Allen and Ullman, 1993; Balana-Fouce *et al.*, 1998; Katzung and Furst, 1998). Also, the substrate specificity of the TbASS enzyme is different from that of the mammalian enzyme (Spector *et al.*, 1982, 1984). In the parasite but not in the host, allopurinol (HPP; 4-hydroxypyrazolo [3,4-*d*] pyrimidine), an isomer of hypoxanthine, is phosphoribosylated into a ribonucleoside 5'-monophosphate HPPR-MP (4-hydroxypyrazolo [3,4-*d*] pyrimidine ribonucleoside) which is further converted to APPR-MP (4-aminopyrazolo [3,4-*d*] pyrimidine ribonucleotide), an isomer of AMP, via the ASS and the adenylosuccinate lyase (ASL) enzymes (Fig. 8.1B, p. 137). APPR-MP is then metabolized into triphosphates and incorporated into the RNA parasite, leading to its death (Spector *et al.*, 1982, 1984). Trypanosomes are susceptible

to inhibition by purine analogues such as HPP and other related compounds that are used as chemotherapeutic agents for trypanosomiasis and leishmaniasis (Spector *et al.*, 1982; Fish *et al.*, 1985; Shapiro *et al.*, 1991; Allen and Ullman, 1993). Despite their structural similarity to purines, the latter agents and their metabolic products are not found in mammalian tissues (Marr and Berens, 1983).

In this study, we describe a DNA fragment isolated from a genomic library that encodes 406 amino acids of the 5' region of the TbASS gene, that is reported for the first time. Tb, from the protozoan order *Kinetoplastida*, seems to have originated as one of the most primitive eukaryotic lineages (Fernandes *et al.*, 1993). It has also been reported that cis introns are absent from the genes of Tb (Perelman and Boothroyd, 1990).

The ASS gene has been cloned in a number of species, including human (Powell *et al.*, 1992), mouse (Guicherit *et al.*, 1991), *Saccharomyces cerevisiae* (Andreichuk *et al.*, 1995), *Escherichia coli* (Wolfe and Smith, 1988), *Edwardsiella ictaluri* (Lawrence *et al.*, 1997), *Dictyostelium discoideum* (Wiesmueller *et al.*, 1991), and *Bacillus subtilis* (Mäntsälä and Zalkin, 1992). Its crystal structure has been extensively studied in *E. coli*, suggesting that the similarities in the GTP-binding domains of the ASS and the p21^{ras} proteins reflect the convergent evolution of two distinct families of GTP (guanosine triphosphate) binding proteins (Poland *et al.*, 1993).

MATERIALS AND METHODS

Library screening. An amplified genomic DNA Tb library (Lueder and Phillips, 1996) (a gift of M. Phillips, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX) was plated at 50,000 pfu/plate (titer of 31.3 pfu/ml), and prepared for screening,

according to the Lambda ZAP II library protocol of Stratagene (LaJolla, CA). Clone 49E12 (a gift of the Institute of Genomic Research, Rockville, MD), encoding a partial sequence of the TbASS enzyme, was prepared with a KpnI-XbaI digest to excise a fragment of 1.5 kb from the pUC18 plasmid. This fragment was purified on an agarose gel, ³²P-labeled with an oligolabeling kit (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) and used as a probe to screen nitrocellulose membranes obtained from the abovementioned plated library. Membranes were hybridized overnight with labeled probe at 42°C and autoradiographed. Positive plaques were isolated and repeated until a single hybridizing plaque was obtained. All DNA clones (in pBluescript SK- plasmids) were recovered from the lambda phages by co-infection with the ExAssist interference-resistant helper phage as indicated by Stratagene.

DNA sequencing and analysis. All DNA clones were sequenced by the dideoxynucleotide chain-termination method at Bio S&T (Lachine, QC, Canada), using a Li-Cor Long Readir 4200 system. Comparative sequences were obtained from GenBank database. Sequence alignment and analysis were performed with the Expsy Proteomics Tools and the National Center for Biotechnology Information Blast softwares.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and characterization of clones. Three clones were isolated from the genomic Tb library, which contained overlapping DNA fragments of 1.3-4.6 kb. From the alignment of these three clones, a consensus nucleotide sequence was obtained. As shown in Figure 8.2 (p. 138), the consensus sequence of the 5' region of the TbASS has

1218 bp with a derived amino acid sequence of 406 amino acids. The site for the start codon (ATG) of the TbASS gene was based on comparative information obtained from the predicted amino acid sequence for *Leishmania major* (also a trypanosomatid protozoan), which suggests M173 as the potential translation start point, as shown in Figure 8.3B, p. 139 (Brown *et al.*, 2000).

According to some experts working with trypanosome genes,¹ the full-length open reading frame of the TbASS is expected to be about 2 kb. If we take into account this assumption, about 260 amino acids are still missing to complete the sequence shown in Figure 8.2 (p. 138).

Comparative database analysis of TbASS 5' region. The derived TbASS amino acid sequence, even if incomplete, shared identity with other known sequences: 34% with *S.cerevisiae*; 30% with mouse; 27% with *E.ictaluri*, *E.coli*, and human; and 26% with *D.discoideum*. Partial alignment of ASS amino acid sequences of Tb and six other species shown in Figure 8.3A (p. 139), demonstrate that identical residues in all sequences, or at least in six of the seven sequences, are most often found at the beginning of the sequences, but they tend to be less common afterwards. TbASS amino acid sequence described in this study shared 69% sequence identity with *L. major* (predicted, partial sequence) (Ivens *et al.*, 1998), another member of the *Kinetoplastida* order, which explains such a high percentage. As shown in Figure 8.3B (p. 139), both sequences have several of their residues that are identical.

A number of identical residues across species is a good indicator that some sequences might be important for conformation and/or activity of the enzyme. Among

¹ Buddy Ullman (Oregon Health Sciences University, Portland, OR) and Najib M. El-Sayed (Institute for Genomic Research, Rockville, MD).

the consensus elements that are reported to be involved in GTP binding, the GX₄GK motif at residues 38-44 in human (Powell *et al.*, 1992) is also present in Tb at residues 8-14, and in all the other eukaryotic or prokaryotic sequences shown in Figure 8.3A (p. 139). This motif is also present in the other trypanosomatid partial sequence shown in Figure 8.3B (p. 139). The lysine residue (K) reported to be important for enzyme activity in *E.coli* (Dong and Fromm, 1990), is well conserved among all sequences shown in Figure 8.3C (p. 139), including in Tb at position 134.

Other motifs mentioned in the literature for GTP binding in eukaryotic or prokaryotic sequences (Powell *et al.*, 1992) could not be found in the 5' region of the TbASS amino acid sequence described in this study, or in the *L.major* ASS sequence. This is probably because of their non-existence in the protozoan order *Kinetoplastida*, or the incompleteness of the reported sequences.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Margaret A. Phillips generous gift of the Tb genomic library (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX), to Dr. Najib M. El-Sayed gift of the 49E12 clone (Institute for Genomic Research, Rockville, MD), and to Dr. Buddy Ullman (Oregon Health Sciences University, Portland, OR) for the initial analysis with information available from the Trypanosome Sequencing Project (Sanger).

We thank Dr. Nasser Fotouhi-Ardakani for advice during the screening process and Dr. George D. Carystinos for computer assistance.

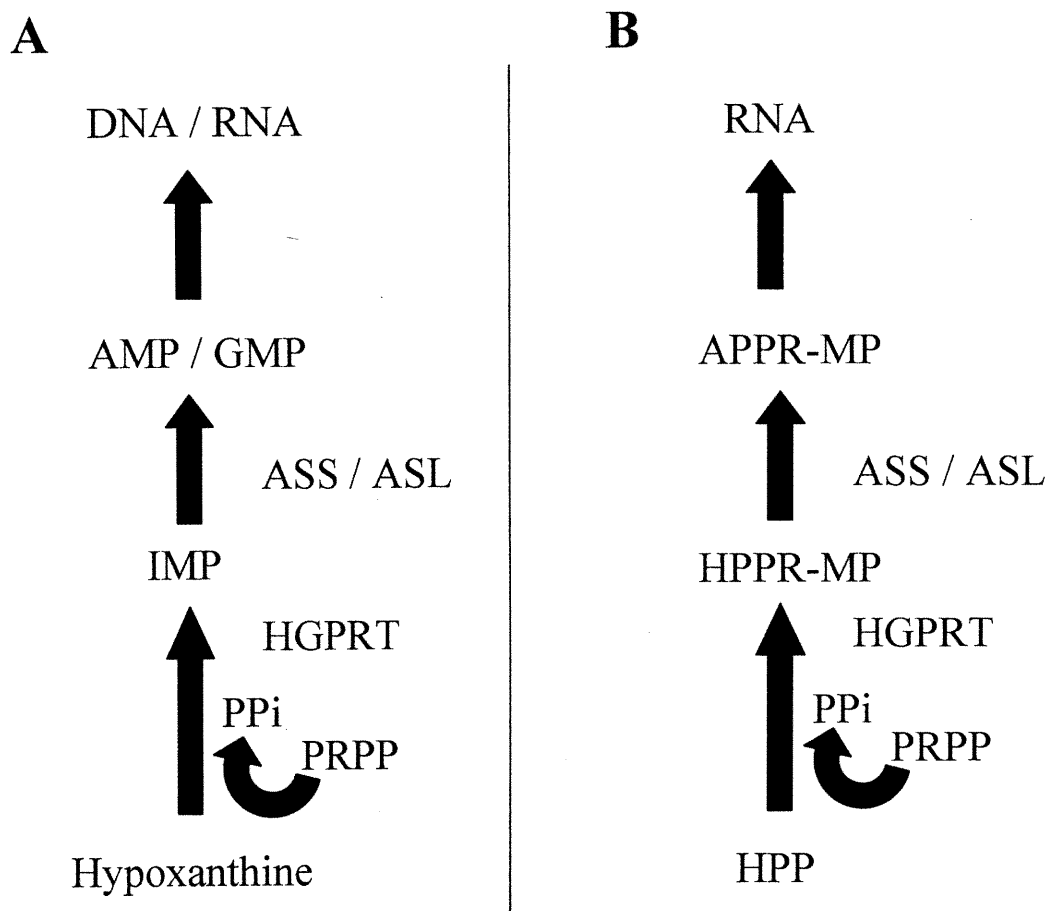


Figure 8.1 Schematic representation of (A) the purine salvage pathway in human. The purine base may be converted back to its ribonucleotide form by HGPRT, using the substrate PRPP; and of (B) the production of allopurinol nucleotide in trypanosome. HPP, allopurinol (4-hydroxypyrazolo [3,4-*d*] pyrimidine; PRPP, 5' phosphoribosyl pyrophosphate; PPi, inorganic pyrophosphate; HGPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; IMP, inosine monophosphate; HPPR-MP, 4-hydroxypyrazolo [3,4-*d*] pyrimidine ribonucleoside; ASS, adenylosuccinate synthetase; ASL, adenylosuccinate lyase; AMP, adenosine monophosphate; GMP, guanosine monophosphate; APPR-MP, 4-aminopyrazolo [3,4-*d*] pyrimidine ribonucleotide; DNA, deoxyribonucleic acid; RNA, ribonucleic acid.

```

-116          TACCTCAAGACTGTTCTCCCATCCCAGAGCTGCGACAGGCGGTAACAATTAAG
-62  AAGTACGAAGAGGCTTCTGTTGATGATACGTTGTACCCGTTGATTGATGAGCACCAGATCATC
  1  ATGGTGGTTCGGTGCCTTTCTTCGGAGATGAGGGAAAGGGGAAGACAGTGGATGCCGTTGCTCGC
(1)  M V V G A F F G D E G K G K T V D A V A R
  64  CACCCCGCATGCACGTGCGTCGCCCCGAGTTAACAGCGGAGAAAATGCTGGACACACAGTCTTT
(22) H P A C T C V A R V N S G E N A G H T V F
 127  GATGACATTGGCCGCAAGTATGTGTTAACCTTGCCCCATCCAGCCTTCTCACGCCCAACACG
(43) D D I G R K Y V F N L A P S S L L T P N T
 190  CGCAACTACGTGAGCTCGGAGTGTGTTATGGTTCCCATTAGCTTCATGGAGAGGGAGATAGGA
(64) R N Y V S S E C V M V P I S F M E R E I G
 253  CAATTTATCAAATCAAATATGCCCTACAAGGACAAGCTCTTTGTTGGCAATGTTTTTGTGGTT
(85) Q F I K S N M P Y K D K L F V G N V F V V
 316  ACACCCTACCACAAGTTGCTTGATTTGCTTGGTTCCGCACCAAACCTCTCAACCTTGAAGGGC
(106) T P Y H K L L D L L G S A P N S S T L K G
 379  ATGTTCCCCATCCATGCCTCAAAGGTGACGAAGCGTGGCATCCGCCTGGACCACATTTTCAAT
(127) M F P I H A S K V T K R G I R L D H I F N
 442  GATGAGGGGGTTCTCCGAGCCCGGCTTGCTAAGGACATGGATACTACTATGGATTGCTAAAA
(148) D E G V L R A R L A K D M D T Y Y G L L K
 505  GTTAAGGGACTAACCGATAAGGATGTGGTCCGCCGCTGTGAAGAGGAGAATGCTGATGGTGTG
(169) V K G L T D K D V V R R C E E E N A D G V
 568  GAGCGTGTGCCAGGTTATGTGGTAGACTTTGCGCGGGCGGAGAATAAGATCGACTATTTGGTG
(190) E R V P G Y V V D F A R A E N K I D Y L V
 631  AAAPTCTACTGAGCGAGTGAAGAACAACAAGAACTTCCCACGGCGTTGTGACGTGACCCAT
(211) K L Y T E R V K N N K N F P R R C D V T H
 694  AAATTACGCGCGGCACTTGCCAGGGGTGAGAAATTGCTGTTGGAGGGCCCGCAGTCCTACTGG
(232) K L R A A L A R G E K L L L E G P Q S Y W
 757  CTGAGTAACGCCCCTGAGAAATTCTGGGAGAGCACCACCTCCGCGGACACGACGGCAGGTGGA
(253) L S N A R E K F W E S T T S A D T T A G G
 820  CTACTGGCCTCTGCTCAGTTCAACTTTTACGCGGTATAAAGTTTTGGTGATTAATGTGCACAAG
(274) L L A S A Q F N F Q R Y K V L V I N V H K
 883  GCACCGGGAAGCAGCCGTGTTGGAATTGGCGCAAACCCAGTAGCTTTGTCCCAGCAAGATTAT
(295) A P G S S R V G I G A N P S S F V P Q D Y
 946  TACTCCGCCCAGGACATAAAGACCCTTGAGGCGCTACCCAAGGGTGGGTGCGTTGACTTCGAC
(316) Y S A Q D I K T L E A A L P K G C V D F D
1009  AAGATTCAAACCTTCTTTTACTACTAAGGCGTTAACACCGAGTCGAAAACCTTTAACGGCATA
(337) K I Q N F F Y T K A F N T E S K T F N G I
1072  TATGAGCCGCTGGAGTACGAGGATGCCACTGGGAAGTATAACATTGGCGTTTCGCGATGTCCAT
(358) Y E P L E Y E D A T G K Y N I G V R D V H
1135  CGCTTCTGCCCCCATCATGGGGAATGCGGTGCAGTCACCAAAAAACCGCGCTCTGCGGGTT
(379) R F C P P S W G M R C S H Q K T A R L R V
1198  CTTGACTGCGTGTGCACTT
(400) L R L R V A L

```

Figure 8.2 Consensus nucleotide sequence of the 5' region of the TbASS gene and the derived amino acid sequence. The coding sequence begins at nucleotide +1 and ends at nucleotide +1218. The single letter code for amino acids is used. The numbers shown correspond to nucleotides, while the numbers in parentheses refer to amino acid residues.

A

Tb	1	MVVGAF FGDEGK GKTVD A V A R H P A C T C V A R V N S G E N A G H T V F D D I G R K Y V F N L A P S S L L T	60
Yeast	4	VVLGS Q W GDEGK GKLV D L L V G K -- Y D I V A R C A G G N A G H T I V V D - G V K Y D F H M L P S G L V N	60
Mouse	35	VVLGA Q W GDEGK GKVVD L L A T D -- A D I V S R C Q G G N A G H T V V V D - G K E Y D F H L L P S G I I N	91
Ei	6	VVLGT Q W GDEGK GKVVD L L T E R -- A K Y V V R Y Q G G H N A G H T L V I N - G E K T V L H L I P S G I L R	62
E.coli	6	VVLGT Q W GDEGK GKIV D L L T E R -- A K Y V V R Y Q G G H N A G H T L V I N - G E K T V L H L I P S G I L R	62
Human	31	VVLGA Q W GDEGK GKVVD L L A Q D A D I V C -- R C Q G G N A G H T V V V D - S V E Y D F H L L P S G I I N	87
Dd	4	I I I G S Q W GDEGK GKLV D I L S Q Q -- F D V V A R C Q G G A N A G H T I V V D - G K K I A L H L I P S G I L N	60
Tb	61	P N T R N Y V S S E C V M - V P I S F M E R E I G Q F I K S N M P Y K D K L F V G N - V F V V T P Y H K L L D L L G S A	118
Yeast	61	P N C Q N L L G N G V V I H V P S F F K E L E T L E - A K G L K N A R S R L F V S S R A H L V F D F H Q V T D K L R E L	119
Mouse	92	T K A V S F I G N G V V I H L P G L F E E A E K N E - K K G L K D W E K R L I I S D R A H L V F D F H Q A V D G L Q E V	150
Ei	63	E N V V S I I A N G V V L A P D A L L - R E M T E L E A R G V P V R E R L L L S E A C P L I L P Y H V A L D N A R E K A	121
E.coli	63	E N V T S I I G N G V V L S P A A L M - K E M K E L E D R G I P V R E R L L L S E A C P L I L D Y H V A L D N A R E K A	121
Human	88	P N V T A F I G N G V V I H L P G L F E E A E K N V Q K G K G L E G W E K R L I I S D R A H I V F D F H Q A A D G I Q E	147
Dd	61	E K A S C I L G N G M V I H L P T F F -- K E V Q G L Q D K G I N Y K G R L F V S D R A H L V F D L H Q M I D A M K E A	118

B

Tb	1	MVVGAF FGDEGK GKTVD A V A R H P A C T C V A R V N S G E N A G H T V F D D I G R K Y V F N L A P S S L L T	60
L.major	173	MVAGAF FGDEGK GKTVD A V A R H P L C T C I A R V N S G E N A G H T V Y D K A G R K F V F N L A P S G L L L	232
Tb	61	P N T R N Y V S S E C V M V P I S F M E R E I G Q F I K S N M P Y K D K L F V G N V F V V T P Y H K L L D L L G S A P N	120
L.major	233	P G K R N Y I G P E C V M D P V S F M E K E V I Q L I D A G I D Y R D R L F I G N V C I V T P Y H K L L D L L G S A A N	292
Tb	121	S S T L K G M F P I H A S K V T K R G I R L D H I F N D E G V L R A R L A K D M D T Y Y G L L K V K G L T D K D V V R R	180
L.major	293	S S T L K G M A P V H G S K V M K R G I R L D H I F N D D E T L R K R L E K D M D T Y F G L L K V K N L S D A D V V R L	352
Tb	181	C E E E N A D G V E R V P G Y V V D F A R A E N K I D Y L V K L Y T E R V K N N K N F P R R C D V T H K L R A A L A R G	240
L.major	353	C R E E N S D G V V R V P D Y V I A F A Q A E D K V E F L V K L Y R D R V R H N P G F P A R C D V T Y E L H A A L L R G	412
Tb	241	E K L L L E G P Q S Y W L S N A R E K F W E S T S A D T T A G L L A S A Q F N F Q R Y K V L V I N V H K A P G S S R	300
L.major	413	E K V L L E G P Q S Y W L S N A R T K F W E S T S A D T T A G L L A A S Q L N F Q K F K S V V L N V H K A P G S S R	472
Tb	301	V G I G A N P S S F V P Q D Y Y S A Q D I K T L E A L P K G G C V D F D K I Q N F F Y T K A F -- N T E S K T F N G I Y	358
L.major	473	V G I G A C P S S F V P Q D Y F S A Q N I K T L R D L P S A T C A H F E A V Q R T L F R D G F P H S N D K A R H N G I M	532
Tb	359	E P L E Y E D A T G K Y N I G V	374
L.major	533	A P V E Y S D E T G T Y N I G V	548

C

Tb	131	H A S K V T K	137
Yeast	142	Y S T K A S R	148
Mouse	171	Y S S K A A R	177
Ei	138	Y E D K V A R	144
E.coli	138	Y E D K V A R	144
Human	169	Y S S K A A R	175
Dd	139	Y S S K A S R	145
L.major	303	H G S K V M K	309

Figure 8.3 ASS amino acid sequence alignment (partial) of (A) Tb (*Trypanosoma brucei*), yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), mouse (*Mus musculus*), Ei (*Edwardsiella ictaluri*), E.coli (*Escherichia coli*), human (*Homo sapiens*), and Dd (*Dictyostelium discoideum*); and of (B) Tb with L.major (*Leishmania major*), both from the *Kinetoplastida* order. In (C), alignment of the lysine residue (K) in all sequences. Bold letters indicate identity in all sequences, or at least in six of the sequences for (A).

REFERENCES

- Allen, T.E. and Ullman, B. (1993). Cloning and expression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene from *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5431-5438.
- Andreichuk, Iu.V., Shabes, A.V., Ryzhova, T.A., Kotova, T.A., and Domkin, V.D. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* ADE12 gene, coding for adenylosuccinate synthetase (EC 6.3.4.4). Cloning, sequencing, expression, and superproduction. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* **1**, 21-28.
- Balana-Fouce, R., Reguera, R.M., Cubria, J.C., and Ordonez, D. (1998). The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharmacol.* **30**, 435-443.
- Brown, S., Murphy, L., Harris, D., Ivens, A.C., Quail, M., Rajandream, M.A., and Barrell, B.G. (2000). Possible adenylosuccinate synthetase (*Leishmania major*). Direct submission, GenBank.
- Dong, Q. and Fromm, H.J. (1990). Chemical modification of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli* by pyridoxal 5'-phosphate. Identification of an active site lysyl residue. *J. Biol. Chem.* **265**, 6235-6240.
- Fernandes, A.P. Nelson, K., and Beverly, S.M. (1993). Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11608-11612.
- Fish, W.R., Marr, J.J., Berens, R.L., Looker, D.L., Nelson, D.J., LaFon, S.W., and Balber, A.E. (1985). Inosine analogs as chemotherapeutic agents for African trypanosomes: metabolism in trypanosomes and efficacy in tissue culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 33-36.
- Guicherit, O.M., Rudolph, F.B., Kellems, R.E., and Cooper, B.F. (1991). Molecular cloning and expression of a mouse muscle cDNA encoding adenylosuccinate synthetase. *J. Biol. Chem.* **266**, 22582-22587.
- Ivens, A.C., Lewis, S.M., Bagherzadeh, A., Zhang, L., Chan, H.M., and Smith, D.F. (1998). A physical map of the *Leishmania major* Friedlin genome. *Genome Res.* **8**, 135-145.
- Katzung, B.G., and Furst, D.E. (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; Disease-Modifying antirheumatic drugs; Nonopioid analgesics; Drugs used in gout. In *Basic and Clinical Pharmacology*. B.G. Katzung, ed. (Appleton & Lange, Stamford, CT) pp. 578-602.
- Lawrence, M.L., Cooper, R.K., and Thune, R.L. (1997). *Edwardsiella ictaluri* adenylosuccinate synthetase (purA) gene, complete cds. Direct submission, GenBank.

- Lueder, D.V., and Phillips, M.A. (1996). Characterization of *Trypanosoma brucei* γ -glutamylcysteine synthetase, an essential enzyme in the biosynthesis of trypanothione (diglutathionylspermidine). *J. Biol. Chem.* **271**, 17485-17490.
- Mäntsälä, P., and Zalkin, H. (1992). Cloning and sequence of *Bacillus subtilis* purA and guaA, involved in the conversion of IMP to AMP and GMP. *J. Bacteriol.* **174**, 1883-1890.
- Marr, J.J., and Berens, R.L. (1983). Pyrazolopyrimidine metabolism in the pathogenic trypanosomatidae. *Mol. Biochem. Parasitol.* **7**, 339-356.
- Perelman, D., and Boothroyd, J.C. (1990). Lack of introns in the ribosomal protein gene S14 of trypanosomes. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 3284-3288.
- Poland, B.W., Silva, M.M., Serra, M.A., Cho, Y., Kim, K.H., Harris, E.M.S., and Honzatko, R.B. (1993). Crystal structure of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 25334-25342.
- Powell, S.M., Zalkin, H., and Dixon, J.E. (1992). Cloning and characterization of the cDNA encoding human adenylosuccinate synthetase. *FEBS Lett.* **303**, 4-10.
- Shapiro, T.A., Were, J.B., Danso, K., Nelson, D.J., Desjardins, R.E., and Pamplin, C.L. (1991). Pharmacokinetics and metabolism of allopurinol riboside. *Clin. Pharmacol. Ther.* **49**, 506-514.
- Spector, T., Berens, R.L., and Marr, J.J. (1982). Adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 225-229.
- Spector, T., Jones, T. E., LaFon, S.W., Nelson, D.J., Berens, R.L., and Marr, J.J. (1984). Monophosphates of formycin B and allopurinol riboside. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1611-1617.
- Trudeau, C., Yuan, S., Galipeau, G., Benlimame, N., Alaoui-Jamali, M.A., and Batist, G. (2001). A novel parasite-derived suicide gene for cancer gene therapy with specificity for lung cancer cells. *Hum. Gene Ther.* **12**, 1673-1680.
- Wiesmueller, L., Wittbrodt, J., Noegel, A.A., and Schleicher, M. (1991). Purification and cDNA-derived sequence of adenylosuccinate synthetase from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **266**, 2480-22485.
- Wolfe, S.A., and Smith, J.M. (1988). Nucleotide sequence and analysis of the purA gene encoding adenylosuccinate synthetase of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **263**, 19147-19153.

CHAPITRE 9**A Study of the Specificity of the Hexokinase Type II
Promoter for Cancer Cells**

**Caroline Trudeau,^{1,2,3} Shala Yuan,^{2,3} George D. Carystinos,^{2,3} and Gerald
Batist^{1,2,3}**

¹Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7
Canada; ²McGill Centre for Translational Research in Cancer, and ³Lady Davis Institute
for Medical Research of the Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital, Montréal,
Québec H3T 1E2 Canada.

Résumé publié dans la revue *Molecular Therapy* 1: S194 (2000).

Chapitre rédigé sous la forme d'un article.

RÉSUMÉ

L'utilisation de promoteurs spécifiques pour la thérapie génique du cancer dépend d'une activité très intense et sélective liée à la cancérisation. L'hexokinase de type II (HK) est surexprimée dans les tumeurs et catalyse la première étape de la glycolyse. Une caractéristique importante des cellules tumorales croissant rapidement est leur haut taux d'utilisation de glucose, comparativement aux cellules normales. À l'aide d'un gène rapporteur, il a été démontré que l'activation de l'HK était de 61% et de 40% dans deux lignées cellulaires de cancer du poumon non à petites cellules (NCI-H661 et H460, respectivement), par rapport à un promoteur constitutif, lorsque son activité était seulement de 0.9% dans des cellules humaines normales épithéliales de bronche (NHBE) (*Hum. Gene Ther.*, 1999, 10, 155). Le but de cette étude est d'identifier les régions régulatrices du promoteur HK qui sont responsables de son activité transcriptionnelle sélective dans les tumeurs, de façon à augmenter son effet de sélectivité dans les cellules cancéreuses. Six délétions en décroissement progressif à partir de l'extrémité 5' du promoteur HK, ainsi qu'une délétion interne, ont été produites par digestion enzymatique. Ces produits ont subséquemment été insérés dans le site de clonage multiple d'un vecteur sans promoteur, contenant un gène rapporteur luciférase pour mesurer et comparer leur activité. Des cellules humaines normales et cancéreuses de poumon ont alors été cotransfectées avec le promoteur HK entier ou avec l'une de ses délétions, ainsi qu'avec un vecteur contrôle ne possédant aucun promoteur. Les tests de luciférase ont révélé une activité 5 à 10 fois plus élevée dans la lignée cellulaire H661 pour les trois dernières délétions en décroissement progressif (fragment 5A: -1215 pb à partir du site de transcription +1; fragment K: -884 pb à partir de +1; fragment L: -486

pb à partir de +1), qu'avec le promoteur HK entier (4.3 kb). Des expériences de retard sur gel ont alors été faites pour déterminer s'il y avait une liaison entre certains facteurs protéiques transcriptionnels et ces fragments précédemment mentionnés, incluant un nouveau subfragment de 0.4 kb nommé (K-L). Une liaison a été observée pour les fragments K, L et (K-L) dans un ordre croissant, tel que décrit de la façon suivante: H661>H460>NHBEK. Nous sommes présentement au stade de vérifier si d'autres segments situés entre K et L sont en mesure de se lier aussi avec des facteurs de transcription, puisque nous soulevons la possibilité de l'existence d'un amplificateur (*enhancer*) dans cette région du promoteur HK, c'est-à-dire une séquence pouvant augmenter de façon significative le taux de transcription dans les cellules cancéreuses. Les conclusions tirées de cette étude pourraient contribuer au développement d'un nouvel outil de contrôle transcriptionnel, permettant l'expression des gènes suicides uniquement dans les cellules cancéreuses ciblées par la thérapie génique.

ABSTRACT

The use of promoters in targeted gene therapy for cancer depends on strong and selective activity. Hexokinase type II (HK) is overexpressed in tumors, and its activation has been demonstrated (luciferase assay) in non-small cell lung carcinomas NCI-H661 and NCI-H460 at 61% and 40%, respectively, compared with a constitutive promoter, when it was 0.9% in a normal human bronchial epithelial cell line (NHBE) (*Hum. Gene Ther.*, 1999, 10, 155). The objective of this study is to identify the regions of the HK promoter that are responsible for its tumor-selective activity, in order to increase the activation in cancer cells. Six 5' progressive deletions as well as one internal deletion of the HK promoter were generated by digestion with different restriction enzymes, and inserted into the multiple cloning site of a promoterless luciferase reporter vector used to monitor transcriptional activity in transfected cells. Human lung normal and cancer cells were cotransfected with the full length HK promoter, or its deletions, and a promoterless control vector. The luciferase assay has shown that the activity is 5 to 10 times higher in H661 with the last 3 progressive deletions (fragment 5A: -1215 bp from the transcription start site +1; fragment K: -884 bp from +1; fragment L: -486 bp from +1), than with the full length HK (4.3 kb). A gel mobility assay was then designed to determine the binding of transcriptional factors to the 3 abovementioned fragments, including a new subfragment of 0.4 kb, i.e. fragment (K-L). Binding was observed for fragments K, L and (K-L) in an increasing pattern according to the following order: H661>H460>NHBE. We are currently in the process of determining if other fragments (between K and L) will also produce some binding of transcriptional factors, since we suspect the presence of an enhancer sequence for tumor cells in that region of the HK

promoter. This may represent a novel tool to improve the design of transcriptionally targeted vectors for suicide gene therapy of cancer.

INTRODUCTION

The use of suicide genes in cancer gene therapy systems is incomplete if they are not driven by a tumor selective promoter instead of a constitutive promoter, in order to target only cancer cells. Several tissue and tumor specific promoters have been tested in various cancer cells for this purpose and they have been described in reviews (Miller and Whelan, 1997; Cooper *et al.*, 1999; Frederiksen *et al.*, 1999; Nettelbeck *et al.*, 2000). To provide safety and efficacy, transcriptionally targeted systems will avoid the expression of the suicide genes in healthy tissues.

The focus of our study is to identify the regions of the rat hexokinase type II promoter (HK) that are responsible for its tumor selective activity. The HK promoter (4.3 kb) has been isolated from a rapidly growing, highly glycolytic hepatoma cell line and characterized (Mathupala *et al.*, 1995; 1997). The selectivity of the HK promoter activation in tumor against normal cells was demonstrated in a previous study done in our laboratory (Katabi *et al.*, 1999). With a chloramphenicol acetyl transferase (CAT) reporter gene assay, it was shown that human non-small cell lung carcinoma cell lines H661 and H460 activity was 61% and 40%, respectively, compared to only 0.9% for a normal human bronchial epithelial cell line (NHBE). Also, in the human breast carcinoma cell line MCF7, the CAT activity was of 20%, compared to 2.4% for a normal human mammary epithelial cell line (NHMEC).

The use of promoters in targeted gene therapy for cancer is based on strong and selective activity closely linked to the cancerization process. In comparison to normal cells, the increased activity of HK which binds to the outer mitochondrial membrane, has been observed in highly glycolytic, growing tumors (Mathupala *et al.*, 1995).

In this study, several deletions of the HK promoter were designed to study the contribution of different segments to its selective activity in cancer cells. We demonstrated that some fragments were sometimes responsible for a higher activation than the full length HK promoter. Our observations may contribute to the development of a novel tool to control transcription of suicide genes in enzyme prodrug activating systems for gene therapy of cancer.

MATERIALS AND METHODS

Constructs design (deletions of the HK promoter). All fragments of the HK promoter were subcloned into the KpnI-XhoI cloning sites of pGL3-Basic (Promega, Madison, WI), a luciferase reporter vector which lacks eukaryotic promoter and enhancer sequences, and contains a modified firefly luciferase cDNA (Promega Corporation, 1994). The full length HK promoter (4.3 kb) was excised with a KpnI-XhoI digest from a previous subcloning into pGL2 vector (Promega) and ligated into pGL3-Basic, in order to create pGL3/HexII. The following constructs (5' progressive deletions; Fig. 9.1A, p. 153) were created by the excision of a fragment at the indicated restriction sites from pGL3/HexII, otherwise indicated: A, SspI-XhoI; B, ApalI-XhoI; C, EcoRV-XhoI; 5A, Sall (partial)-XhoI; K, AflII-XhoI; L, PstI-XhoI, from pGL3/K. An additional construct, 5A-(K-L), was created by an internal deletion of a 398 bp fragment (K-L) from pGL3/5A (AflII-PstI digest). The remaining portion of the 5A fragment already into pGL3 was religated to create 5A-(K-L) (Fig. 9.2A, p. 155). An additional fragment of 316 bp (5A-K), used only for gel mobility assay, was created by a Sall-AflII digest from pGL3/5A. Restriction and cloning enzymes were obtained from Amersham

Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC, Canada), New England Biolabs (Mississauga, ON, Canada) and MBI Fermentas (Burlington, ON, Canada).

Cells and cell culture. The human non-small cell lung carcinomas H460 and H661 (American Type Culture Collection [ATCC], Rockville, MD), were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. The NHBE cell line (ATCC) was maintained in BEGM (Clonetics, San Diego, CA). All cell lines were maintained at 37°C under 5% CO₂.

Transfection. H661, H460, and NHBE cells were plated at a density of 0.5×10^5 cells/well in 24-well plates (Costar, Cambridge, MA) and incubated for 24 hr at 37°C under 5% CO₂. Transient transfection was done by overlaying on cells a mixture of lipofectamine (InVitrogen, Burlington, ON, Canada), 0.5 picomole of each construct subcloned into pGL3-Basic vector, and 0.1 picomole of the promoterless control vector PRL-null (Promega), for an incubation period of 5 hr. Cells were further incubated with fresh medium for 48 hr and prepared as described below for luciferase assay. The cotransfected control reporter vector is used as an internal control. It serves as the baseline response and reduces experimental variability (Promega Corporation, 1997).

Luciferase assay. Transfected cells (no more than 95% confluent) were washed with phosphate buffer saline (PBS) and incubated at room temperature for 15 min with 100 µl of Passive Lysis Buffer (Promega) on a rocking platform, as recommended by the manufacturer. The lysates were collected and prepared with the reagents used to perform the luciferase assay, according to the Dual-Luciferase Reporter Assay protocol (Promega Corporation, 1997), which measures the firefly luciferase and the *Renilla* luciferase

luminescence signals. The measurements were recorded with a EG & G Berthold Lumat LB9507 luminometer (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA).

Gel mobility assay. A mixture of 10 μ g of proteins (whole cells extracts from H661, H460, or NHBEC) with DNA binding assay buffer (20mM hepes pH 7.9, 5% glycerol, 0.1M KCl, 0.2mM EDTA pH 8.0, 0.2mM EGTA pH 8.0, and 0.2% 1M DTT) were incubated for 20 min at room temperature with a radiolabeled probe containing the DNA fragment of interest (10 ng/ μ l). Samples were loaded onto 4% native acrylamide (60:1) gels in Tris Glycine. Gels were dried and exposed overnight on X-Omat film (Eastman Kodak, Rochester, NY).

RESULTS AND DISCUSSION

Constructs design and corresponding luciferase activity. The full length HK promoter and six of its 5' progressive deletions were subcloned into the pGL3 luciferase reporter vector, as illustrated in Figure 9.1A (p. 153). The results of the first luciferase assays in cell lines transfected with this set of deletions was expressed in % of the full HK activity, in order to find out which segments contribute the most to its transcriptional activity. As shown in Figure 9.1B (p. 154), the activity is at least four times higher in the non-small cell lung carcinoma H661 with the last three progressive deletions, than with the full length promoter: 450%, 738%, and 448%, for deletions 5A, K, and L, respectively. In the non-small cell lung carcinoma H460, deletions 5A and K are also among the deletions showing the highest activity, although less strong than in H661 cell line, i.e. 203% and 293% of the full length HK activity, for deletions 5A and K, respectively (Fig. 9.1B, p. 154). In the NHBEC cell line, these three fragments, i.e. 5A,

K, and L, also show the highest activity, but to a lesser extent than in the H661 and H460 lung carcinoma cell lines (Fig.9.1B, p. 154). These results demonstrate the abundance of certain protein transcription factors in lung carcinoma cell lines H661 and H460, as opposed to the non transformed NHBEC cell line, that probably recognize and bind to specific DNA motifs of these segments of the HK promoter (deletions 5A, K, and L), which are responsible for the higher activity observed.

After this first set of luciferase assays, we designed an additional construct, 5A-(K-L), as shown in Figure 9.2A (p. 155). This construct, which contains an internal deletion of 398 bp from 5A that overlaps both 5A and K, was tested for luciferase activity, along with constructs 5A, K, and L. To our great surprise, the activity of the 5A-(K-L) construct decreased by about one half of the 5A activity in H661 (48%) and H460 (57%) cells, as shown in Figure 9.2B (p. 156).

Analysis of gel mobility assays. As shown in Figure 9.3 (p. 157), we observed binding of proteins for fragments K, L, and (K-L), in an increasing pattern according to the following order: H661>H460>NHBEC. These observations for fragments K and L are consistent with the % of full length HK activity obtained with the luciferase assays. For the (K-L) fragment, the gel mobility assay confirms that this segment of 398 bp appears to be important for the tumor-specific activity of the HK promoter as observed with the luciferase assay results, since it binds proteins in a pattern consistent with the observed activity.

Another gel mobility assay was performed with a (5A-K) fragment of 331 bp, which is a deletion of 5A that eliminates the segment that overlaps with K, but located upstream of the abovementioned (K-L) fragment. The gel revealed no binding of

proteins (data not shown). This latter negative result leads us to assume that some DNA motifs important for the binding of protein transcription factors responsible for the activity of the HK promoter, might be located in the (K-L) segment. More fragments between K and L need to be studied in order to verify if they will produce some binding of proteins, since we suspect the presence of an enhancer sequence for cancer cells in this region of the HK promoter. An interesting approach to improve the activity of a selective promoter, is to identify the segments that contribute to its transcriptional strength and to multimerize these enhancer sequences (Nettelbeck *et al.*, 2000).

Also, we observed that the deletion of p53 wild type in H460 cell line and p53 mutant in H661 cell line, resulted in an increased promoter activity. As shown in Figure 9.1A, all 5' progressive deletions did not include the two p53 motifs at positions -4250 and -4195 from the transcription start site +1 (Mathupala *et al.*, 1997). Although p53 may function as a repressor of the HK promoter in normal cells, there might be another upstream repressor element independent of p53.

As shown in Table 9.1 (pp. 156A-B), there are different binding sites for transcription factors that might be involved in the activity of the 5' progressive deletions of the HK promoter. In the case of deletion K, that showed the highest activity in % of the full HK promoter (738% in H661 and 293% in H460), and for fragment (K-L) that showed a decrease of about 50% of the 5A construct activity when it was deleted from this latter construct, a combination of several factors might be responsible for these results. In both cases, there are transcriptional binding sites that are unique to these fragments: F-ACT1 (factor for actin-1 or YYY1) that is known to suppress muscle alpha-actin expression and to maintain *c-myc* expression in

proliferating myoblasts (Lee *et al.*, 1991; 1992; 1994), and CRE (cyclic AMP response element). There are also other factors, but not unique to deletion K and fragment (K-L): NF-IL6 (nuclear factor for interleukin 6), Ap-1 (activator protein-1), Ap-2, and c/ebp (CCAAT-enhancer binding protein). Ap-1 regulates the expression of genes coding for glycolytic and gluconeogenic enzymes (Lemaigre and Rousseau, 1994), and Ap-2 is inducible by protein kinase A and protein kinase C pathways (Faisst and Meyer, 1992). A recent study has shown a previously unknown role for c/ebp transcription factor in glucocorticoid signaling in the lung epithelium (Berg *et al.*, 2002).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marie Norbert for technical assistance.

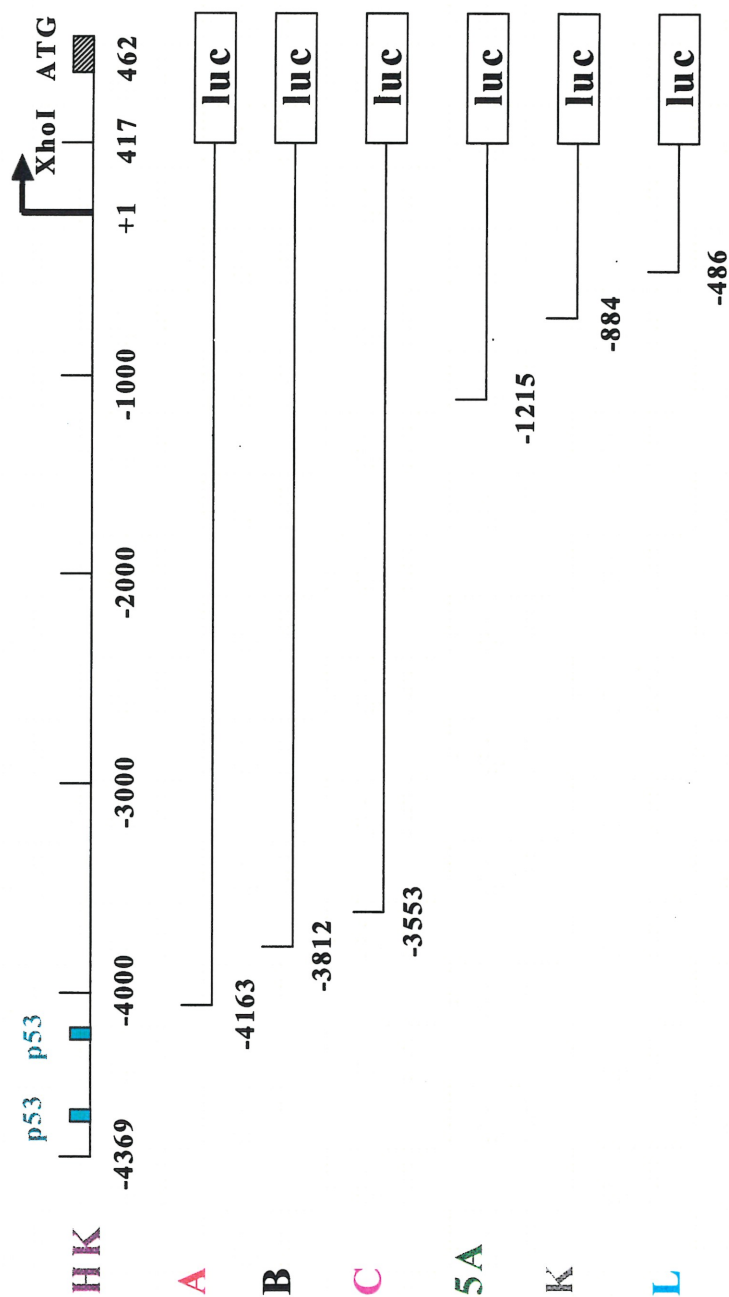


Figure 9.1 (A) Schematic representation of the 5' progressive deletions of the HK promoter subcloned into the pGL3-Basic luciferase reporter vector, as described in Materials and Methods. The modified firefly luciferase cDNA is represented by luc. The transcription start site is indicated by +1. The HK promoter is reproduced according to Mathupala *et al.* (1995; 1997).

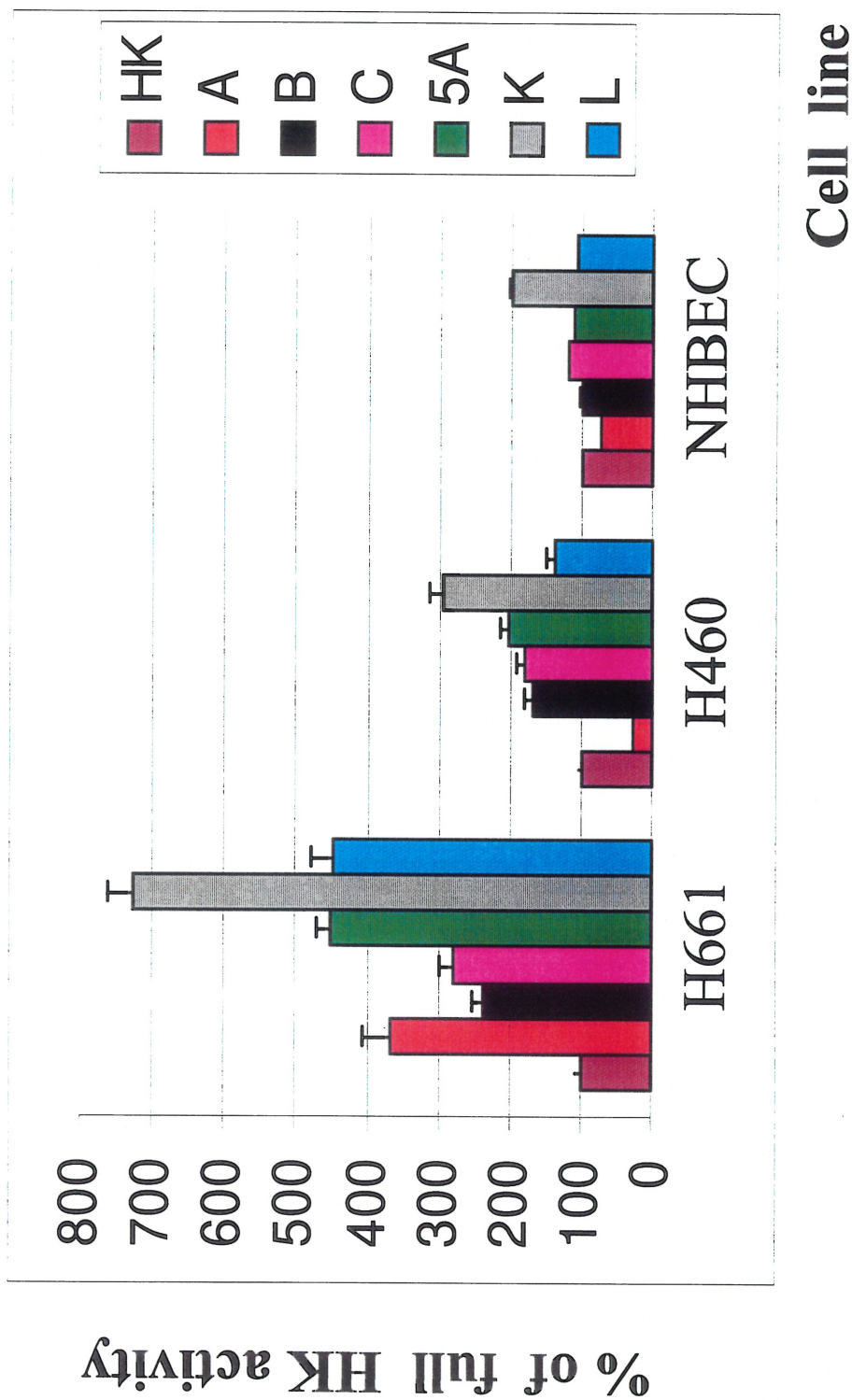


Figure 9.1 (B) Luciferase assay results in cell lines transfected with the full length HK promoter and the indicated 5' progressive deletions shown in Fig. 9.1(A). The results are expressed in % of the full length HK activity. The % is the result of at least two independent experiments. Bars indicate SE.

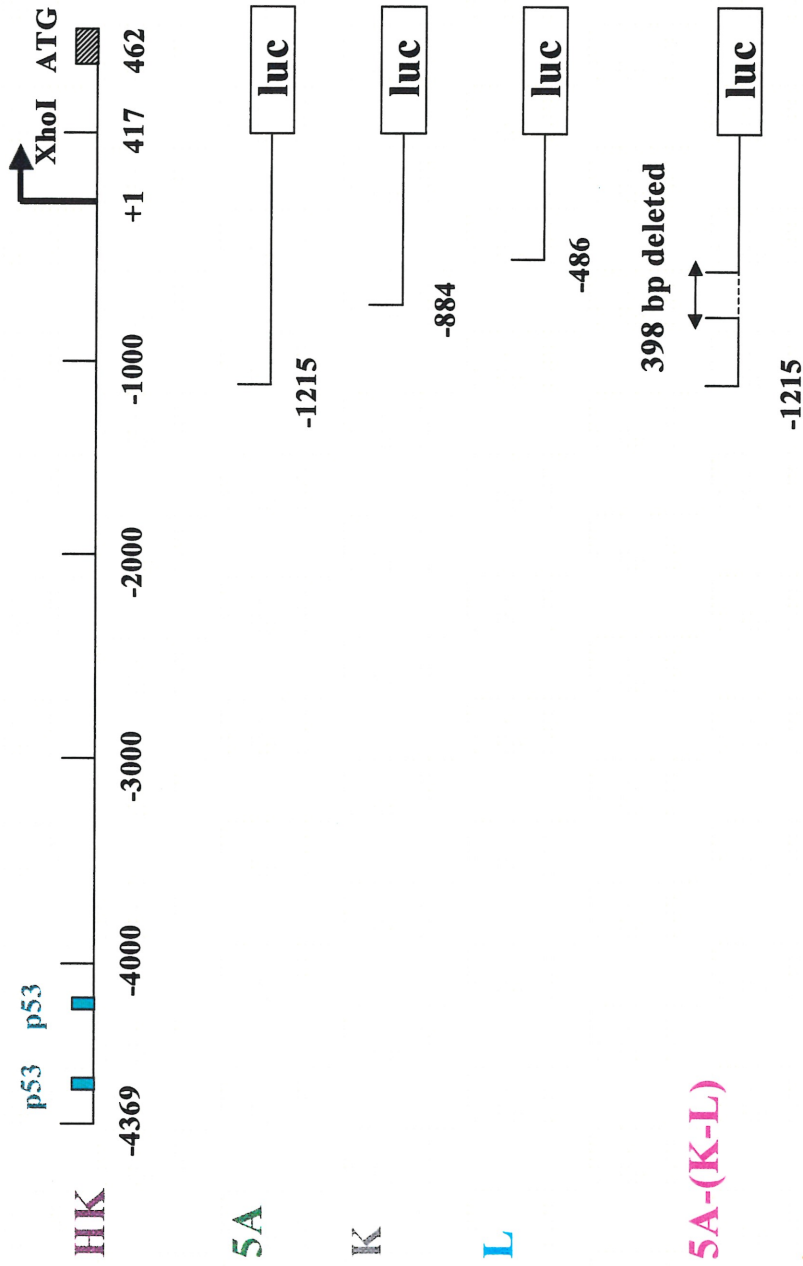
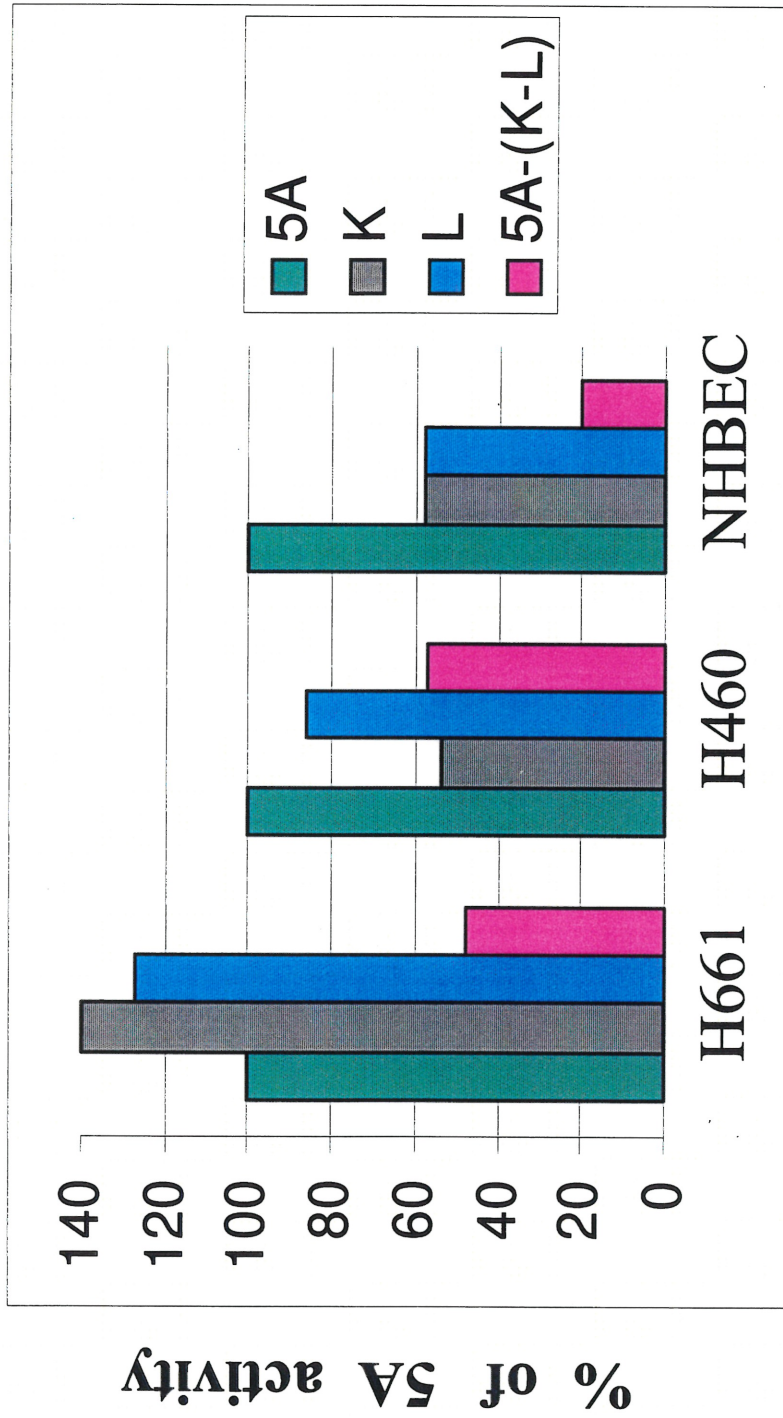


Figure 9.2 (A) Schematic representation of the 5A-(K-L) construct subcloned into the pGL3-Basic luciferase reporter vector, as described in Materials and Methods. The modified firefly luciferase cDNA is represented by luc. The transcription start site is indicated by +1. The HK promoter is reproduced according to Mathupala *et al.* (1995; 1997).



Cell line

Figure 9.2 (B) Luciferase assay results in cell lines transfected with the 5A-(K-L) construct shown in Fig. 9.2(A). The results are expressed in % of the 5A construct.

Fragment	Transcription factors (and other elements)	Position of DNA motif (binding site)
A (-4163 to +417)	HNF-5, Ap-3, c/ebp	-4163
	IRE	-4139
	Myb	-4048
	HNF-5	-3917
	PEA-3, SRE, Ap-2	-3866
B (-3812 to +417)	Sp-1, E-box, HIF-1	-3812
	E-box, HIF-1	-3765
	c/ebp	-3730
	PEA-3	-3647, -3629
C (-3553 to +417)	Ap-1	-3471, -2736, -2325, -1957
	HNF-5	-3333, -2205
	Sp-1	-3294, -2226
	PEA-3	-3258, -1419, -1372
	PPAR	-2956
	c/ebp, NF-IL6	-2554
	Ap-2	-2045, -1968, -1504, -1268
	NF-IL6, Ap-1	-1594
	Myb, Mbf-1, Mep-1, Mtf-1	-1462
	c/ebp	-1444
	Myb	-1382
	SRE	-1294

Table 9.1 Transcription factors (and other elements) linked to DNA motifs identified in the fragments of the HK promoter, after the 5' progressive deletions (continued on next page). The numbers in parentheses correspond to the actual position on the full length HK promoter (refer to Figure 9.1A, p. 153). Please refer to page 156C for the abbreviations used.

Fragment	Transcription factors (and other elements)	Position of DNA motif (binding site)
5A (-1215 to +417)	Myb	-1205
	SRE	-1147
	Sp-1, Ap-2, SRE	-1114
	c/ebp	-1064
	NF-IL6	-1018
K (-884 to +417) and fragment (K-L) (\approx 400 bp)	Ap-1	-863
	Ap-2	-668
	c/ebp	-658, -624
	F-ACT1	-612
	CRE	-534
	NF-IL6	-513
L (-486 to +417)	SRE	-388
	Ap-2	-319, -41
	CREB/ATF	-299
	c/ebp	-260
	ATF-1	-70
	Sp-1	-58

Table 9.1 (continued) Transcription factors (and other elements) linked to DNA motifs identified in the fragments of the HK promoter, after the 5' progressive deletions. The numbers in parentheses correspond to the actual position on the full length HK promoter (refer to Figure 9.2A, p. 155). The transcription factor binding sites indicated for the corresponding fragments are lost after the 5' progressive deletion, according to the following order: A>B>C>5A>K>L. Inversely, the transcription factor binding sites described for construct L are also included in fragment K, and the ones in K are included in 5A, and so on until fragment A. Please refer to page 156C for the abbreviations used.

Table 9.1 (continued) Transcription factors (and other elements) linked to DNA motifs identified in the fragments of the HK promoter, after the 5' progressive deletions.

The elements in this table were reproduced according to Mathupala *et al.* (1995; 2001).

Note: the full HK promoter contains two p53 motifs at positions -4250 and -4195 (Mathupala *et al.*, 1997), which were not included in any of the fragments described.

The abbreviations used are: Ap, activator protein; ATF, activating transcription factor; c/ebp, CCAAT-enhancer binding protein; CRE, cyclic AMP response element; CREB, CRE binding protein; E-box, CACGTG motif; F-ACT, factor for actin; HIF, hypoxia-inducible factor; HNF, hepatocyte nuclear factor; IRE, iron responsive element; Mbf, multiprotein bridging factor; Mep, metal element protein; Myb, myeloblastosis virus oncogene; Mtf, metal-regulatory element binding transcription factor; NF-IL, nuclear factor for interleukin; PEA, polyomavirus enhancer A; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; Sp, specificity protein; SRE, steroids.

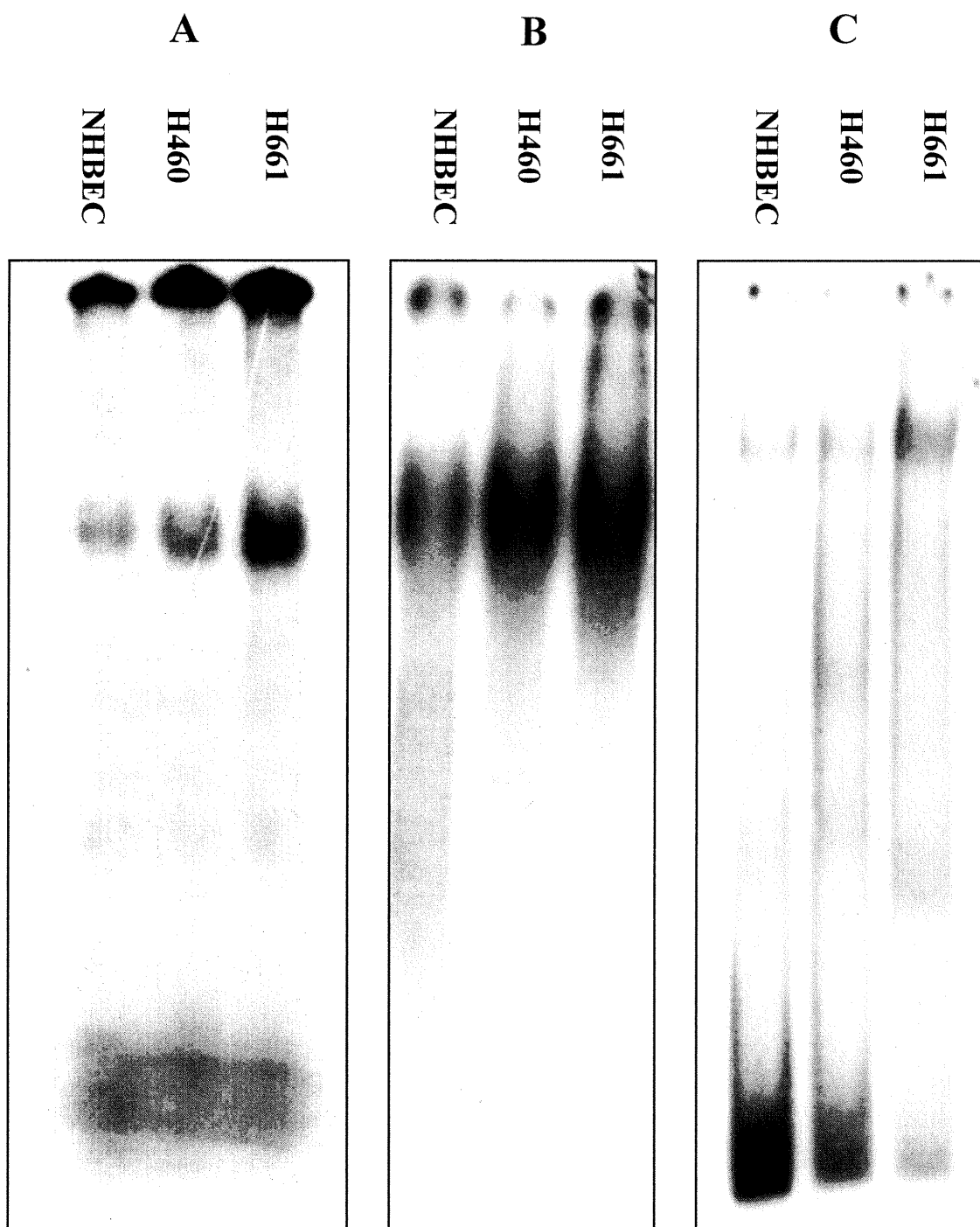


Figure 9.3 Gel mobility assays done with the radiolabeled fragments incubated with whole cell extracts of the indicated cell lines. Shown in (A) fragment K (1.3 kb); in (B) fragment L (0.9 kb); in (C) fragment (K-L) (0.4 kb). Samples were loaded onto 4% acrylamide gels (60:1).

REFERENCES

- Berg, T., Cassel, T.N., Schwarze, P.E., and Nord, M. (2002). Glucocorticoids regulate the CCSP and CYP2B1 promoters via C/EBP beta and delta in lung cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 907-12
- Cooper, M.,J. (1999). Non-infectious gene transfer and expression systems for cancer gene therapy. In *Gene Therapy of Cancer; Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp.77-94.
- Faisst, S., and Meyer, S.(1992). Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3-26.
- Frederiksen, K.S., Petri, A., Abrahamsen, N., and Poulsen, H.S. (1999). Gene therapy for lung cancer. *Lung cancer.* **23**, 191-207.
- Katabi, M.M., Chan, H.L., Karp, S.E., and Batist, G. (1999). Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter for gene-targeted therapy differentially expressed and regulated in human cancer cells. *Hum. Gene Ther.* **20**, 155-164.
- Lee, T.C., Chow, K.L., Fang, P., and Schwartz, R.J. (1991). Activation of skeletal alpha-actin gene transcription: the cooperative formation of serum response factor-binding complexes over positive cis-acting promoter serum response elements displaces a negative-acting nuclear factor enriched in replicating myoblasts and nonmyogenic cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5090-5100.
- Lee, T.C., Shi, Y., and Schwartz, R.J. (1992). Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal alpha-actin transcription in embryonic myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9814-9818.
- Lee, T.C., Zhang, Y., and Schwartz, R.J. (1994). Bifunctional transcriptional properties of YY1 in regulating muscle actin and c-myc gene expression during myogenesis. *Oncogene* **9**, 1047-1052.
- Lemaigre, F.P., and Rousseau, G. (1994). Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem. J.* **303**,1-14.
- Mathupala, S.P., Heese, C., and Pedersen, P.L. (1997). Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J. Biol. Chem.* **272**, 22776-22780.
- Mathupala, S.P., Rempel, A., and Pedersen, P.L. (1995). Glucose catabolism in cancer cells. Isolation, sequence, and activity of the promoter for type II hexokinase. *J. Biol. Chem.***270**,16918-16925.

Mathupala, S.P., Rempel, A., and Pedersen, P.L. (2001). Glucose catabolism in cancer cells. Identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J. Biol. Chem.* **276**, 43407-43412.

Miller, N., and Whelan, J. (1997). Progress in transcriptionally targeted and regulatable vectors for genetic therapy. *Hum. Gene Ther.* **8**, 803-815.

Nettelbeck, D.M., Jérôme, V., and Müller, R. (2000). Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. *Trends Genet.* **16**, 174-181.

Promega Corporation (1994). pGL3 Luciferase Reporter Vectors Technical Manual (Web version available at www.promega.com). Madison, WI. 28 p.

Promega Corporation (1997). Dual-Luciferase Reporter Assay System Technical Manual. Madison, WI. 22 p.

DÉCLARATION DES COAUTEURS D'UN RÉSUMÉ

1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom: Trudeau

Prénom: Caroline

Titre du programme (sigle): Ph.D. Pharmacologie (3-520-1-0).

Faculté: Médecine.

Département: Pharmacologie.

Université: Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

2. Description du résumé

Titre: A Study of the Specificity of the Hexokinase Type II Promoter for Cancer Cells.

Auteurs: Caroline Trudeau, Shala Yuan, George D. Carystinos, et Gérald Batist.

Revue: Molecular Therapy, Volume 1, Numéro 5, p.S194.

Date: Mai 2000.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur du résumé identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Caroline Trudeau inclue ce résumé dans sa thèse de doctorat qui a pour titre «Étude de gènes suicides et de promédicaments pour la thérapie génique du cancer.»

Shala Yuan



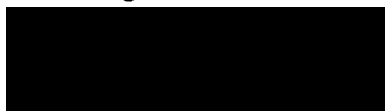
Feb. 14, 2002

Coauteur

Signature

Date

George D. Carystinos



Feb. 25, 2002

Coauteur

Signature

Date

Gérald Batist



12/03/02

Coauteur

Signature

Date

1455 SHERBROOKE ST. WEST APT. 606
 MONTREAL (QUEBEC)
 CANADA H3G 1L2
 FAX: (514) 933-3473

FAX TRANSMISSION

TO: MARITZA VILLALOBOS FAX NO: [REDACTED]
 ACADEMIC PRESS DATE: JAN. 30, 2002
 FROM: CAROLINE TRUDEAU PAGE(S): 1

REC'D 6/3/2002

Dear Ms. Villalobos,

I am a Ph.D. student in Pharmacology at Université de Montréal (Montréal, QC, Canada), and I need a letter from Academic Press, that gives me the authorization to include in my thesis the abstract entitled, «A Study of the Specificity of the Hexokinase Type II Promoter for Cancer Cells», by Caroline Trudeau, Shala Yuan, George D. Carystinos, and Gerald Batist. It was published in Molecular Therapy, as of May 5, 2000 (Volume 1: S194).

I am the first author of this abstract and the title of my Ph.D. thesis is «Étude de gènes suicides et de promédicaments pour la thérapie génique du cancer» (A Study on Suicide Genes and Prodrugs for Cancer Gene Therapy). This request for an authorization from the editor is part of the requirements of the Faculty of Graduate Studies of Université de Montréal.

Thank you for your cooperation and please do not hesitate to contact me if you need further information. Please send the letter at my abovementioned address.

Sincerely,

[REDACTED]



PERMISSION GRANTED
 provided that:

~~you obtain the permission of the author(s);~~
 your research confirms that the material in
 question is original to our text and appears
 without credit or acknowledgement to
 another source; proper credit is given to
 our publication(s).

[REDACTED]

Date 2/5/02

ACADEMIC PRESS, INC.
 Orlando, Florida 32887-6777

TROISIÈME PARTIE:

CONCLUSION

CHAPITRE 10: Discussion générale

Dans cette thèse, deux systèmes de gènes suicides ont été créés à l'aide d'un vecteur rétroviral. Ce type de vecteur a été choisi à cause de l'expression stable du matériel génétique qu'il transfère dans les cellules cibles. Une expression stable est nécessaire pour avoir un effet thérapeutique avec les gènes suicides. Les paragraphes suivants résument les faits saillants des articles précédemment présentés et proposent des applications futures de cette technologie.

10.1 Évaluation du gène suicide PGA et de la prodox (article 1)

Cette étude démontre que malgré les démonstrations rapportées dans la littérature pour *E. coli*, il est très difficile d'avoir une conformation fonctionnelle de la PGA dans les cellules de mammifères. D'après les expériences réalisées, je peux conclure que la maturation de cette protéine utilise des éléments appartenant uniquement au monde procaryotique. Une autre façon de tenter l'activation de la prodox chez les cellules exprimant déjà le gène PGA entier (i.e. pPGAiGFP; se référer à la Fig. 6.2A, *Top*, p. 83), serait de les cotransduire avec une chaperonne impliquée dans le repliement post-traductionnel de protéines sécrétées par certaines bactéries (Sriubolmas *et al.*, 1997), en espérant qu'une maturation normale de la protéine PGA s'effectue. Cependant, certains auteurs dont Choi *et al.* (1992), mentionnent que les protéases impliquées à chaque étape de la maturation de la protéine PGA n'ont pas encore été identifiées. L'architecture du gène PGA n'est probablement pas celle d'un gène suicide idéal tel que discuté au Chapitre 1, à cause de la présence du peptide connecteur séparant les sous-unités α et β . Pourtant, une approche semblable avait été utilisée pour la carboxypeptidase G2 de

Pseudomonas, un gène d'origine bactérienne qui avait été exprimé dans des cellules humaines (Marais *et al.*, 1996). Lors de la construction du vecteur, le peptide signal avait été éliminé, jugé non nécessaire dans les cellules de mammifères. Ce système avait alors activé le promédicament de façon efficace, comparativement à une construction antérieure, incluant le peptide signal du gène, qui n'avait rien activé du tout. Lors de mes essais préliminaires avec le gène PGA, j'ai aussi testé une construction du même genre, c'est-à-dire le gène PGA sans le peptide signal, et cela n'a donné que des résultats négatifs pour l'activation de la prodox (données non présentées au Chapitre 6).

La raison pour laquelle les sous-unités α et β ont été insérées sur deux rétrovecteurs distincts au lieu d'un seul, est que la seconde protéine aurait été produite en quantité moindre, un désavantage des rétrovecteurs contenant une séquence IRES, tel que mentionné au Chapitre 3. Aussi, la création d'un système avec deux vecteurs distincts contenant chacun une des deux sous-unités de PGA, était tout à fait conforme aux travaux de Burtscher et Schumacher (1992), qui avaient reconstitué l'expression chez *E.coli*. Ce n'est pas non plus l'usage des rétrovecteurs qui nuit à la maturation du gène PGA, car les mêmes constructions que celles présentées au Chapitre 6 ont été testées dans des vecteurs plasmidiques d'expression spécifique aux mammifères (transfection transitoire). Cela a donné les mêmes résultats que ceux présentés au Chapitre 6.

Quant à la prodox, elle semblait être un promédicament idéal, car tous les tests exécutés (HPLC, MS) ont confirmé sa stabilité et sa pénétration dans les cellules.

En plus de l'architecture particulière du gène PGA qui déjà été discutée (i.e. la présence d'un peptide connecteur), il y a d'autres désavantages à utiliser ce gène d'origine bactérienne. L'enzyme produite n'est pas monomérique, la masse moléculaire est élevée (95 kDa pour le précurseur; 24 et 65 kDa pour les sous-unités α et β , respectivement). Aussi, des réactions immunitaires potentielles pourraient survenir lors du transfert dans les cellules humaines.

Une application future pour explorer davantage le système PGA/prodox pourrait éventuellement inclure: a) une analyse du site catalytique avec des outils informatiques; b) le design du prototype d'une enzyme qui serait fonctionnelle dans les cellules de mammifères; et, c) un test *in vitro* permettant la transcription/traduction de la version améliorée du gène PGA dans un vecteur contenant un promoteur T7, afin de produire une quantité suffisante de protéine dans le but de vérifier s'il y a une activation de la prodox.

Une autre source de pénicilline amidase comme gène suicide pourrait être considérée. Une alternative que j'ai suggéré est l'isopénicilline N acyltransférase produite par le gène penDE de *Penicillium chrysogenum* (Barredo *et al.*, 1989; Alvarez *et al.*, 1993). Ce gène produit un précurseur polypeptidique de 40 kDa donnant une enzyme de 29 kDa qui possède l'activité pénicilline amidase, ainsi qu'une protéine de 11 kDa dont la fonction est inconnue. Comme la plupart des pénicillines amidases d'origine eucaryotique, l'enzyme de *P. chrysogenum* démontre une activité hydrolytique plus élevée pour les chaînes latérales de phénoxy méthylpénicilline (100%), que pour la benzylpénicilline

(55% de l'activité) (Alvarez *et al.*, 1993). À ce stade, il faut se rappeler que les pénicillines amidases bactériennes préfèrent hydrolyser les benzylpénicillines (pénicilline G), que les phénoxyéthylpénicillines (pénicilline V) (Virden, 1990). Pour cette raison, il n'y a aucune certitude que la prodox utilisée dans cette étude (Chapitre 6), dont la structure moléculaire (cf. Figure 2.1, p. 29) a été synthétisée en fonction d'une pénicilline amidase d'origine procaryotique, soit hydrolysée de façon efficace par l'enzyme produite par le gène penDE (communication personnelle du Dr Juan Martin, Institut de Biotechnologie, INBIOTEC, Leon, Espagne). J'ai envoyé des échantillons de prodox à un collaborateur potentiel afin de vérifier la capacité hydrolytique de l'enzyme en question, mais pour des raisons de personnel, il était impossible de purifier davantage de cette enzyme.

10.2 Évaluation du gène suicide TbHGPRT et de l'HPP (article 2)

Le développement de TbHGPRT représente une découverte intéressante, car d'une part c'est le premier gène suicide dérivé d'un parasite et d'autre part, il possède une spécificité d'expression chez cinq lignées cellulaires cancéreuses de poumon (NSCLC). Ceci a été une découverte tout à fait fortuite, puisque au début de cette étude, nous ne cherchions pas une application précisément orientée vers le cancer du poumon.

Le cancer du poumon est une cause importante de mortalité dans plusieurs pays et son taux de survie (cinq années) est de 10% à 13%, un des plus bas parmi tous les types de cancer (Kwong *et al.*, 1997). Pour les cas de NSCLC, les lignées affectées par TbHGPRT/HPP dans cette étude, environ deux tiers des patients ont une maladie inopérable au stade du diagnostic, à cause de la présence de métastases (Kwong *et al.*,

1997). Parmi les stratégies de thérapie génique appliquées dans le cas des NSCLC, on retrouve l'inactivation des oncogènes *c-myc* et *K-ras in vitro* par la technique des ODNs antisens et l'introduction du gène suppresseur de tumeur p53 WT dans les tumeurs de patients (Frederiksen *et al.*, 1999). La thérapie génique suicide a donc maintenant une application *in vitro* avec la combinaison TbHGPRT/HPP pour inhiber la prolifération des NSCLC.

La raison pour laquelle le système TbHGPRT/HPP est efficace dans les NSCLC est inconnue, mais les hypothèses pouvant expliquer cette cytotoxicité sélective sont les suivantes:

1) La localisation cellulaire de la protéine TbHGPRT

Même si l'expression de la protéine TbHGPRT a été démontrée à l'aide d'un transfert Western (se référer à la Fig. 7.1C, p. 111), chez sept lignées cellulaires autres que des NSCLC qui sont résistantes à l'HPP, il est possible que la localisation cellulaire de la protéine soit en cause. La Figure A.1 (p. xxvi) démontre que la localisation cellulaire de TbHGPRT dans le cas des cellules DA3 (carcinome mammaire de souris) est aussi cytoplasmique diffuse comme dans les cas d'une lignée NSCLC (A549) qui est sensible à l'HPP (se référer à la Figure 7.2, p. 112). La localisation cellulaire n'est donc pas un facteur contribuant à cette spécificité pour les NSCLC.

2) La contribution du système de réparation de l'acide nucléique

Si on examine de plus près ce qui se produit avec d'autres analogues de purines utilisés en chimiothérapie, comme par exemple les 6-thiopurines dont la 6-TG et la 6-MP qui

sont d'ailleurs activées par la HGPRT humaine endogène, on réalise que la cytotoxicité est liée à l'intervention d'un facteur de réparation de l'acide nucléique, le «*DNA mismatch repair*» (Karan et Bignami, 1996; Swann *et al.*, 1996). La principale fonction de ce système est de vérifier l'ADN nouvellement synthétisé et de corriger les erreurs que l'ADN polymérase aurait commises. Quelques modèles ont été proposés pour montrer que c'est en fait une tentative de réparation par ce système qui cause la mort cellulaire (Karan et Bignami, 1996; Swann *et al.*, 1996). Les thiopurines sont normalement incorporées dans l'ADN après avoir été métabolisées par la voie qui recycle les bases puriques. Une fois incorporée, on sait que la 6-TG est susceptible à une méthylation peu fréquente par une enzyme intracellulaire adénosylméthionine. Lors de la prochaine réplication d'ADN, la 6-TG méthylée peut accepter l'incorporation de thymine (T) comme base complémentaire. Cette paire défectueuse G-T sera repérée par le système «*DNA mismatch repair*» qui tentera de faire une correction. La tentative de réparation échoue puisque l'excision est normalement orientée vers le brin nouvellement synthétisé, tandis que la base défectueuse (i.e. la base 6-TG méthylée) ne sera pas excisée et va demeurer dans le brin parent d'ADN. Cette base défectueuse non excisée, va demeurer à sa position originale et va provoquer d'autres tentatives de réparation infructueuse. Conséquemment, les interruptions correspondantes dans le brin d'ADN complémentaire vont mener à la mort cellulaire. Enfin, il est intéressant de mentionner que les cellules résistantes à la 6-TG et à d'autres agents anti-cancéreux, ont perdu cette capacité de «*DNA mismatch repair*,» i.e. cette réparation d'ADN non parfaitement apparié.

Il est donc possible qu'une telle incapacité à réparer les lésions causées par une base défectueuse, c'est-à-dire l'incorporation de l'HPP dans l'ADN, ne soit présente que chez les cellules cancéreuses de poumon, ce qui expliquerait la cytotoxicité sélective du système d'activation TbHGPRT/HPP. On peut suggérer l'intervention d'un mécanisme de réparation qui aurait des conséquences comme le «*DNA mismatch repair.*»

3) La contribution de l'enzyme ASS

Les voies métaboliques impliquant l'ASS ont déjà été révisées au Chapitre 8 (se référer à la Figure 8.1, p. 137). Même s'il a été rapporté que le niveau de l'enzyme ASS est plus élevé dans certaines tumeurs humaines dont le rein et le foie (Jackson *et al.*, 1975), aucune revue jusqu'à présent n'en fait mention spécifiquement pour le poumon cancéreux. Ceci pourrait contribuer à expliquer la cytotoxicité observée lors de mes expériences *in vitro*, mais il n'existe encore moins de revue comparative de la concentration de l'ASS dans plusieurs tissus néoplasiques. Aussi, des études chez les parasites ont révélé que le ribonucléoside HPPR-MP n'est pas un substrat pour l'enzyme spécifique aux mammifères ASS, puisque le ribonucléotide APPR-MP n'a pas été retrouvé dans les prélèvements de tissus infectés (Spector *et al.*, 1982; Marr et Berens, 1983). Ce dernier élément amènerait donc un paradoxe dans l'hypothèse que c'est l'enzyme ASS endogène humaine qui catalyse l'incorporation d'une fausse base dans l'ADN de la cellule de poumon cancéreux pour éventuellement conduire à sa mort.

4) La déficience des pools endogènes de nucléotides

Certaines études expliquent la résistance à certains analogues pyrimidiques utilisés pour la chimiothérapie du cancer, par l'augmentation des pools endogènes de nucléotides correspondants (Momparler *et al.*, 1997). Dans le cas de la cytosine arabinoside

(cytarabine), les cellules cancéreuses avec des pools élevés de dCTP montraient une résistance à cet analogue, puisque les dCTP agissent comme un inhibiteur rétroactif de la déoxycytidine kinase. Cette dernière est l'enzyme endogène responsable de l'activation de la cytosine arabinoside en sa forme monophosphate (AraCMP), qui sera subséquemment métabolisée en triphosphate (AraCTP).

Quelle est donc le lien entre ce phénomène de résistance, décrit ici pour illustrer l'influence des pools intracellulaires de nucléotides, et la cytotoxicité sélective du système TbHGPRT/HPP chez les NSCLC? Puisque la résistance est liée à l'augmentation des pools de nucléotides, l'inverse pourrait être possible. La susceptibilité au système cytotoxique en question pourrait bien être liée à une diminution des pools endogènes de nucléotides GTP ou ATP dans les NSCLC (je mentionne ATP et non pas seulement GTP, puisqu'il y existe une interconversion de l'IMP en nucléotides de l'adénosine et de la guanosine). Conséquemment, les analogues de nucléotides de l'HPP seraient moins en compétition pour l'ADN polymérase qu'avec les nucléotides endogènes de la cellule. Une raison expliquant la réduction possible des pools endogènes de nucléotides est que l'enzyme endogène HGPRT est déficiente. C'est justement ce qui a été observé dans plusieurs cas de résistance aux 6-thiopurines: il y a une diminution de l'activité de cette enzyme. Certaines études font d'ailleurs mention d'une mutation du gène HGPRT dans plusieurs lignées cellulaires de carcinome dont le côlon et le poumon (Driscoll *et al.*, 1997; Ohzeki *et al.*, 1997). Un autre facteur contribuant, déjà mentionné au Chapitre 2, est le fait que l'HPP diminue la biosynthèse *de novo* des purines, sans toutefois affecter la synthèse des nucléotides puriques. Néanmoins, s'il y a moins de

bases puriques disponibles, si l'HGPRT endogène est déficiente, et s'il y a présence d'une enzyme TbHGPRT utilisant l'HPP comme substrat, cela pourrait contribuer à une plus grande production de faux nucléotides contenant l'HPP, via la voie de récupération des bases puriques.

L'enzyme xanthine oxydase (XO) pourrait aussi contribuer à cette hypothèse. L'HPP est un inhibiteur connu de la XO, ce qui empêche la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, puis de la xanthine en acide urique, pour prévenir la formation de cristaux d'urates (se référer à la Figure 2.6, p. 40). Aussi, l'HPP est elle-même un substrat pour la XO et est transformée en alloxanthine. Cependant, l'activité de la XO est basse dans le poumon humain (Kinnula *et al.*, 1997) ainsi que dans certaines tumeurs (Lorenzini *et al.*, 1994), ce qui fait qu'il y aurait potentiellement plus de molécules d'HPP disponibles pour être métabolisées par TbHGPRT. Ce facteur pourrait contribuer à augmenter le pool de faux nucléotides formés à partir d'HPP, au lieu d'aller vers la voie de conversion de l'HPP en alloxanthine.

Plusieurs applications futures sont possibles pour explorer davantage le système TbHGPRT/HPP. Tout d'abord, une étude de l'effet de voisinage serait intéressante. Dans cette expérience, différentes proportions de cellules transduites avec TbHGPPRT et de cellules non transduites seraient mélangées pour ensuite être exposées à l'HPP, afin de comparer la cytotoxicité relative. Selon la littérature, et tel que mentionné au Chapitre 1, dans le cas des analogues de purine comme l'HPP, il semblerait qu'un contact intercellulaire soit essentiel pour obtenir l'effet de voisinage. Il existe aussi des façons

indirectes d'améliorer la cytotoxicité de ce système en favorisant l'effet de voisinage. Cela peut se faire en augmentant les jonctions de type *gap* par l'introduction de la Cx43 (Carystinos *et al.*, 1999), ou en exposant les cellules cibles exprimant déjà TbHGPRT à des agents pharmacologiques (Schatzlein, 2001).

Une autre expérience envisageable serait de tenter d'introduire le gène TbHGPRT chez des cellules humaines normales de poumon (cela s'est avéré impossible à plusieurs reprises avec la lignée NHBEC). Cela permettrait de savoir si l'activation du système TbHGPRT/HPP est vraiment spécifique au poumon de nature cancéreuse ou au poumon en tant que tissu. Comme il sera discuté à la section 10.4, le résultat de cette expérience pourrait avoir un impact sur la décision d'inclure un promoteur spécifique de tumeur pour le poumon dans le système TbHGPRT/HPP.

Une autre suggestion d'expérience future est d'étudier des analogues de purine différents de l'HPP qui ne sont plus actifs en tant qu'agents de chimiothérapie, à cause d'un manque d'activation par des enzymes endogènes. Dans cette étude (Chapitre 7), un autre analogue a été testé, la 6-TG. Cet analogue n'a pas démontré aucune activation par l'enzyme TbHGPRT, puisque cette dernière est très sélective dans la reconnaissance des substrats. En effet, il a été rapporté que TbHGPRT préfère les bases naturelles telles que l'hypoxanthine et la guanine, est capable de phosphoribosyler l'HPP, mais ne reconnaît pas la xanthine et l'adénine en tant que substrats (Allen et Ullman, 1993). Une recherche approfondie de la littérature sur les médicaments utilisés pour combattre les parasites de la famille *Trypanosomatidae*, révèle qu'un analogue de l'hypoxanthine, la formycine B,

possède une toxicité *in vivo* plutôt basse et pourrait donc être un promédicament à tester avec TbHGPRT (Marr et Berens, 1983).

Une dernière suggestion d'application future pour ce système, serait de poursuivre des études dans un modèle animal ou de développer un modèle animal approprié. J'a fait une étude pilote avec des souris C57BL/6, en utilisant un modèle très connu de tumeur SC. Ce modèle consiste à injecter dans le flanc des souris trois groupes différents de cellules *Lewis lung carcinoma*: WT (contrôle négatif), transduites avec le rétrovecteur vide (contrôle négatif), ou exprimant TbHGPRT. La drogue (ou la saline) est alors administrée aux souris pendant trois à quatre semaines. Le gène suicide en question s'est exprimé dans les tumeurs et un transfert de type Western l'a confirmé; ceci est présenté à la figure A.2 (p. xxvii). Ce résultat préliminaire est intéressant car souvent, le problème en thérapie génique, est de pas réussir un bon transfert de l'information génétique. Cependant, aucune régression des tumeurs n'a été observée. À mon avis, un des problèmes importants est la formulation plus ou moins stable de la drogue utilisée. Comme il n'existe pas de formulation intraveineuse au Canada, j'ai utilisé une suspension de comprimés d'HPP réduits en une fine poudre mélangée à de la saline (Koyama *et al.*, 1999). Cette suspension d'HPP a alors été administrée par la voie intrapéritonéale (Koyama *et al.*, 1999). L'HPP est une drogue très peu soluble dans l'eau et l'alcool (American Society of Health-System Pharmacists, 2002b) et il existe aussi des suspensions orales à base d'hydroxyméthylcellulose 1% ou 2% (Martz *et al.*, 1989; American Society of Health-System Pharmacists, 2002b), mais cela n'est pas techniquement pratique avec des souris. Pour régler ce problème, j'ai fait une demande à

l'étranger auprès d'une société qui manufacture une formulation intraveineuse de l'HPP mais malheureusement, à cause d'une certaine lourdeur administrative, je n'ai pu obtenir jusqu'à ce jour la drogue en question.

Un autre problème avec l'étude pilote *in vivo* décrite ci-haut, est le modèle animal qui n'est peut-être pas approprié. Une alternative serait de répéter la même technique dès le départ, mais de prolonger l'étude en excisant les tumeurs primaires qui ont proliféré suite à l'injection SC de cellules *Lewis lung carcinoma*. Ensuite, on peut observer s'il y a un effet du système TbHGPRT/HPP sur les métastases aux poumons qui se développent aussi avec ce modèle chez la souris. Il arrive que la drogue n'ait aucun effet sur les tumeurs primaires à cause d'un temps d'exposition trop court, mais qu'un effet peut être décelé en comparant l'étendue du développement des métastases par rapport aux groupes contrôles (communication personnelle du Dr Moulay Alaoui-Jamali, Institut Lady Davis de Recherches Médicales, Montréal, QC, Canada).

10.3 Évaluation du gène suicide potentiel TbASS (article 3)

L'ASS est un autre gène suicide potentiel provenant du parasite Tb. J'ai découvert ce gène dans la littérature après avoir débuté tous mes autres travaux présentés dans cette thèse, et c'est alors que je l'ai proposé en tant que gène suicide potentiel. Selon plusieurs chercheurs ayant œuvré dans le domaine, l'enzyme TbASS possède une capacité de métaboliser les substrats HPP et un dérivé, l'HPP riboside, ce que ses homologues humains sont incapables de faire (Spector *et al.*, 1982; Fish *et al.*, 1985; Shapiro *et al.*, 1991; Allen et Ullman, 1993). L'HPP et l'HPP riboside sont donc des promédicaments activables par TbASS.

Au stade où le projet est rendu, je ne peux pas prédire ce que seront les résultats, sauf que certains facteurs semblent encore plus favorables que le système TbHGPRT/HPP pour obtenir une activation efficace:

- 1) Dans les tissus de mammifères, l'HPP riboside (contrairement à l'HPP) n'est pas convertie par la XO en oxypurinol (se référer à la Figure 2.6, p. 40), un métabolite normal de l'HPP (Shapiro *et al.*, 1991). Une partie de l'inactivation du promédicament par l'hôte serait donc éliminée grâce à l'HPP riboside;
- 2) Le mécanisme d'action qui s'effectue par l'intermédiaire d'une liaison à une GTP (Poland *et al.*, 1993) ou potentiellement à des analogues ayant une structure similaire, pourrait produire des métabolites toxiques qui diffusent à travers les membranes cellulaires, ce qui est avantageux pour l'effet de voisinage. En effet, une étude de Krohne *et al.* (2001) a révélé que des analogues puriques pouvaient produire des métabolites très toxiques qui diffusaient à travers les membranes et interféraient avec la synthèse de l'ADN, l'ARN et des protéines. Je tiens à souligner qu'une séquence consensus impliquée dans la liaison à une GTP (motif GX₄GK, selon Powell *et al.*, 1992) a été identifiée dans la séquence nucléotidique de TbASS (Figure 8.3A, p. 139).

Une application future serait de co-transduire les cellules exprimant déjà TbHGPRT avec TbASS (entièrement cloné), et de les exposer à l'HPP, afin de comparer la cytotoxicité par rapport à des cellules contrôles transduites uniquement avec TbHGPRT.

Si on se réfère au schéma de la Figure 8.1 (p. 137) et qu'on l'examine de près, on constate que le système potentiel TbASS/HPP ou HPP riboside aurait besoin d'un co-facteur qui est l'enzyme ASL. Selon Spector *et al.* (1984), les enzymes ASL de trypanosome ou de mammifère acceptent plusieurs substrats et sont capables de métaboliser plusieurs analogues avec efficacité. L'enzyme ASL ne serait donc pas un facteur limitant dans l'activation du système TbASS/HPP ou HPP riboside.

En résumé, le système TbASS/HPP ou HPP riboside représente à mon avis un potentiel énorme pour la thérapie génique suicide.

Le clonage de la portion manquante (région 3') du gène TbASS peut être complété de plusieurs façons:

- 1) Le fragment cloné dans l'étude (1218 pb appartenant à la région 5') peut servir de sonde pour cribler à nouveau la banque d'ADN génomique, tel que décrit au Chapitre 8. Cette approche a parfois le désavantage de retirer de la banque des fragments presque identiques à ceux déjà obtenus.
- 2) Des oligonucléotides d'environ 20 pb peuvent être utilisés pour détecter et amplifier par la technique PCR (*polymerase chain reaction*) la séquence d'ADN manquante (i.e. environ 780 pb) du gène TbASS. Puisque les fragments d'ADN génomique de la librairie ont été insérés dans un plasmide commercial (pBluescript SK- de Stratagene) dont la séquence est connue, on peut utiliser une paire d'oligonucléotides dont le premier reproduirait la séquence en aval ou en amont du site de clonage

multiple du plasmide (i.e. le promoteur T3 ou T7 dans ce cas), et le second oligonucléotide correspondrait à une séquence dans la région 3' du fragment obtenu, par exemple, les paires de bases 1027 à 1047 (Figure 8.2, p. 138). Après amplification de la banque d'ADN génomique, il resterait à séquencer les produits obtenus. Cette approche est assez empirique et parfois aléatoire.

- 3) Comme précédemment décrit, l'amplification par la technique PCR peut être utilisée, mais pour créer une nouvelle sonde à l'aide d'oligonucléotides dégénérés, c'est-à-dire qui reproduisent toutes les possibilités de séquences nucléotidiques à partir de séquences choisies d'acides aminés (Matton, 1997). Dans le cas de ASS, on a pu constaté qu'il n'y a pas vraiment de séquences conservées entre différentes espèces, au fur et à mesure qu'on se dirige vers la région 3' du fragment (Figure 8.3A, p. 139). Heureusement, l'alignement du gène ASS de Tb avec *L. major*, un autre membre de la famille *Trypanosomatidae*, donne plusieurs séquences conservées (Figure 8.3B, p. 139). À titre d'exemple, les résidus 291-298 de Tb (ou 463-470 de *L. major*) ayant le motif NVHKAPGS, et les résidus 370-374 de Tb (ou 544-548 de *L. major*) ayant le motif YNIGV, pourraient servir à la réalisation des oligonucléotides dégénérés. Après amplification, un nouveau fragment (d'environ 250 pb avec les oligonucléotides décrits) sera disponible pour cribler à nouveau la banque d'ADN. Cette stratégie de clonage est beaucoup plus spécifique et précise. Elle est habituellement utilisée pour débiter le clonage d'un gène lorsqu'on ne possède pas de fragment initial comme le clone 49E12 au Chapitre 8. Les oligonucléotides

dégénérés sont alors basés sur des séquences très conservées d'acides aminés entre plusieurs espèces.

10.4 Évaluation de l'étude sur le promoteur HK (article 4)

Une étude avec ce promoteur spécifique de tumeur a démontré qu'une activité transcriptionnelle plus intense était liée à certains fragments en particulier (i.e. les trois dernières délétions en décroissement progressif à partir de l'extrémité 5'), et non pas à tout le promoteur en entier. Ceci est le cas pour plusieurs promoteurs décrits dans la littérature et au Chapitre 4 (Osaki *et al.*, 1994; Coulson *et al.*, 1999). L'incorporation d'un de ces fragments de promoteur dans les systèmes de gènes suicides pourrait contribuer à mieux cibler les cellules cancéreuses. J'ai suggéré d'inclure une de ces délétions en décroissement progressif les plus actives dans le système TbHGPRT/HPP, pour en faire un système tout à fait complet pour les NSCLC, mais la décision du laboratoire a été d'utiliser le gène suicide TK dont l'activité est plus connue et plus cytotoxique.

Une application future pour ce projet consisterait à tester d'autres fragments encore plus petits que ceux présentés au Chapitre 9, de façon à vérifier s'il y a une activité transcriptionnelle toujours aussi intense ou encore plus intense qu'avec ceux déjà décrits. Le fragment donnant le meilleur résultat pourrait être testé dans un modèle animal de carcinome de poumon ou de métastase pulmonaire, puisque c'est le tissu où l'activité était la plus intense (Katabi *et al.*, 1999).

Lors de cette étude, une analyse a révélé que plusieurs facteurs de transcription peuvent agir sur le promoteur HK de rat, en particulier sur les régions éliminées (Tableau 9.1, pp. 156A-B). Les sites pour les facteurs de transcription présents sur le segment (K-L), dont la délétion a eu une grande influence sur l'activité du fragment 5A (i.e. une baisse d'environ 50% de son activité originale), ont déjà été décrits au Chapitre 9. D'autres motifs valent la peine d'être mentionnés ici, puisqu'ils ont fait l'objet de discussion dans la littérature. Les motifs *E-box* (CACGTG), situé aux positions -3809 et -3765 du promoteur HK, sont éliminés lors de la délétion progressive en 5', du fragment B à C (ils sont inclus dans les fragments A et B). Une autre étude sur un promoteur ciblant aussi le poumon, le promoteur AVP (arginine vasopressine), a démontré l'importance de ce motif. Lorsque ce dernier était éliminé du promoteur AVP, une réduction de l'activité de 75% était observée chez les SCLC (Coulson *et al.*, 1999). Dans l'étude sur le promoteur HK, l'élimination de ce motif ne semble pas avoir eu beaucoup d'influence chez les cellules NSCLC, puisque l'activité était environ la même (H460), ou légèrement plus élevée (H661) avec le fragment C, comparativement au fragment B. Le motif *E-box* a été identifié comme étant impliqué dans la modulation de la réponse au glucose (Vaulont et Khan, 1994), et aussi dans le contrôle circadien de l'expression de certains éléments nucléaires (Jin *et al.*, 1999).

L'intérêt pour ces deux motifs *E-box* sur le promoteur HK, vient aussi du fait qu'ils sont tous les deux chevauchés par un motif pour le facteur HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*). Il est connu que les conditions d'hypoxie sont liées aux cellules cancéreuses, et sous ces conditions, le taux de transcription du même promoteur HK que celui utilisé dans la

présente étude, serait augmenté de trois (sans glucose) jusqu'à sept fois (avec glucose), lorsque ces séquences distales *E-box/HIF-1* sont conservées (Mathupala *et al.*, 2001). Dans la présente étude, il est difficile de vérifier l'impact qu'aurait pu avoir ces séquences, puisque les conditions d'incubation étaient normales après la transfection (i.e. une teneur normale en oxygène).

Un autre facteur de transcription d'intérêt est PEA-3 (*polyomavirus enhancer A-3*), car on retrouve six de ces sites sur le promoteur HK et il est inclus dans les constructions A, B, et C. Ce facteur est inductible par les oncoprotéines *v-src*, *v-mox*, *v-raf*, et *c-Ha-ras* (Gutman et Wasylyk, 1990), ce qui pourrait contribuer à expliquer l'activité transcriptionnelle sélective du promoteur HK dans les cellules cancéreuses. Cependant, ce site n'était pas présent dans les fragments ayant démontré la plus grande activité (i.e. 5A, K, et L), ou dans le segment (K-L), responsable d'une perte d'activité de 50% par rapport au fragment 5A. Un autre facteur lié à la cancérisation est PPAR (*peroxidase proliferator-activated receptor*), présent à un seul site (-2956), et inclus dans les fragments A, B, et C. Ce facteur jouerait un rôle dans le développement tumoral au niveau du poumon et ce phénomène a été étudié chez les NSCLC (Theocharis *et al.*, 2002). Tel que précédemment décrit pour PEA-3, ce site n'était pas présent dans les fragments ayant démontré la plus grande activité.

Un dernier facteur valant la peine d'être mentionné est *c/ebp* (*CCAAT-enhancer binding protein*), car il est présent à huit endroits sur le promoteur HK et sur tous les segments étudiés. L'étude de Mathupala *et al.* (1995) mentionne que c'est le seul facteur parmi

plusieurs autres facteurs de transcription de type HNF (*hepatocyte nuclear factor*), connus pour être abondants dans le foie, qui a été retrouvé sur le promoteur HK (celui-ci a été cloné à partir d'une librairie d'ADN génomique isolée de cellules tumorales de foie de rat). On peut alors soulever l'hypothèse qu'il existe peut-être des variations oncogéniques de facteurs encore non identifiés sur le promoteur HK. Aussi, une étude récente a cité le rôle du facteur c/ebp dans la signalisation cellulaire au niveau de l'épithélium pulmonaire (Berg *et al.*, 2002). Ceci pourrait peut-être contribuer à expliquer pourquoi l'activité du promoteur HK est si intense dans le carcinome de poumon (Katabi *et al.*, 1999).

On peut conclure qu'il est difficile d'identifier quels facteurs de transcription, de façon isolée, expliquent l'activité et/ou la spécificité des divers fragments du promoteur HK. Il faut plutôt s'orienter vers des études de combinaison et/ou d'interaction de facteurs transcriptionnels.

Dans cette étude, ce sont des séquences HK de rat et non des séquences humaines qui ont été utilisées, et ceci pour des raisons pratiques et historiques. Le promoteur HK a été mis à la disposition du laboratoire lors d'une étude antérieure (Katabi *et al.*, 1999). Le chercheur qui a fourni ce promoteur, avait déjà étudié que l'enzyme HK de type II était surexprimée dans les cellules tumorales de foie de rat (AS-30D), comparativement au foie normal de rat (Nakashima *et al.*, 1984; Arora et Pedersen, 1988). Les cellules AS-30D croissent rapidement et démontrent un taux élevé de glycolyse. Naturellement, cela explique l'abondance de l'HK de type II, dont le rôle est de catalyser la première étape de

la glycolyse, et le promoteur HK de rat a donc été isolé à partir d'une librairie d'ADN génomique provenant des cellules de rat AS-30D (Mathupala *et al.*, 1995). Grâce au projet de découverte du génome humain, une application future serait de comparer les séquences HK humaine et de rat qui sont liées à des facteurs de transcription. L'alignement des séquences nucléotidiques du promoteur HK humain (3,9 kb; Malkki *et al.*, 1997) et du promoteur HK de rat (4,3 kb; Mathupala *et al.*, 1995), a donné 77-88% d'homologie dans certaines régions (réalisé avec le programme BLAST du *National Center for Biotechnology Information*).

10.5 Conclusion

Les résultats de cette thèse démontrent qu'il existe des possibilités de développer des outils innovateurs pour la thérapie génique du cancer, dont les gènes suicides et des séquences régulatrices (promoteurs) contrôlant leur expression.

En conclusion, je ne crois pas que la thérapie génique va remplacer complètement tous les traitements actuels (par exemple, les résections chirurgicales qui ont un pronostic acceptable quand un cancer est diagnostiqué à un stade précoce), mais elle peut grandement contribuer à des cas qui ne répondent pas à des traitements conventionnels, les compléter et peut-être même les substituer dans l'avenir. Actuellement, la thérapie génique semble s'orienter vers des systèmes de plus en plus perfectionnés, c'est-à-dire le développement de vecteurs toujours plus performants pour améliorer l'efficacité du transfert génétique, l'addition de promoteurs spécifiques à ces vecteurs pour mieux cibler les cellules d'intérêt et, aussi, des combinaisons de gènes suicides pour obtenir une synergie des promédicaments activés.

BIBLIOGRAPHIE

Adam, M.A., Ramesh, N., Miller, A.D., and Osborne, W.R. (1991). Internal initiation of translation in retroviral vectors carrying 5' nontranslated regions. *J. Virol.* **65**, 4985-4990.

Allen, T.E., and Ullman, B. (1993). Cloning and expression of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene from *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5431-5438.

Alnemri, E.S. (1997). Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J. Cell. Biochem.* **64**, 33-42.

Alvarez, E., Meesschaert, B., Montenegro, E., Gutiérrez, S., Diez, B., Barredo, J.L., and Martin, J.F. (1993). The isopenicillin-N acyltransferase of *Penicillium chrysogenum* has isopenicillin-N amidohydrolase, 6-aminopenicillanic acid acyltransferase and penicillin amidase activities, all of which are encoded by the single penDE gene. *Eur. J. Biochem.* **215**, 323-332.

American Society of Health-System Pharmacists. (2002a). Doxorubicin hydrochloride. In *American Hospital Formulary Service Drug Information*. G.K. McEvoy, ed. (Authority of the Board of Directors of the American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD) pp. 984-994.

American Society of Health-System Pharmacists. (2002b). Allopurinol. In *American Hospital Formulary Service Drug Information*. G.K. McEvoy, ed. (Authority of the Board of Directors of the American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, MD) pp. 3578-3581.

Arcamone, F., Animati F., Berettoni M., Bigioni M., Capranico G., Casazza A.M., Caserini C., Cipollone A., De Cesare M., Franciotti M., Lombardi P., Madami A., Manzini S., Monteagudo E., Polizzi D., Pratesi G., Righetti S.C., Salvatore C., Supino R., and Zunino F. (1997). Doxorubin disaccharide analogue: apoptosis-related improvement of efficacy *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1217-1223.

Arora, K.K., and Pedersen, P.L. (1988). Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J. Biol. Chem.* **263**, 17422-17428.

Association des pharmaciens du Canada. (2000). Caelyx (Chlorhydrate de doxorubicine, liposomes). Dans *Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques*. 35ème éd. L.D. Bruce, éd. (Association des pharmaciens du Canada, Ottawa, ON) pp. 273-275.

Association pharmaceutique canadienne. (1997a). Adryamicin (Chlorhydrate de doxorubicine). Dans *Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques*. 32ème éd. L.D. Bruce, éd. (Association pharmaceutique canadienne, Ottawa, ON) pp. 41-43.

Association pharmaceutique canadienne. (1997b). Allopurinol. Dans *Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques*. 32ème éd. L.D. Bruce, éd. (Association pharmaceutique canadienne, Ottawa, ON) pp. 60-62.

Azas, N., Di Giorgio, C., Delmas, F., Gasquet, M., and Timon-Davis, P. (1997). *Leishmania infantum* promatigotes: flow cytometry as a possible tool for assembling the effects of drugs on cellular functions. *Exp. Parasitol.* **87**, 1-7.

Bagshawe, K.D., Springer, C.J., Searle, F., Antoniow, P., Sharma, S.K., Melton, R.G., and Sherwood, R.F. (1988). A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites. *Br. J. Cancer* **58**, 700-703.

Barredo, J.L., van Dolingen, P., Diez, B., Alvarez, E., Cantoral, J.M., Kattevilder, A., Smaal, E.B., Gronen, M.A. M., Veenstra, A.E., and Martin, J.F. (1989). Cloning and characterization of the acyl-coenzyme A: 6-aminopenicillanic-acid-acyltransferase gene of *Penicillium chrysogenum*. **83**, 291-300.

Baum, C., Ostertag, W., Stocking, C., and von Laer, D. (1999). Retroviral vector design for cancer gene therapy. In *Gene Therapy of Cancer; Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp. 51-76.

Beardmore, T.D., and Kelley, W.N. (1974). Effects of allopurinol and oxipurinol on pyrimidine biosynthesis in man. In *Purine Metabolism in Man*, O. Sperling, S. DeVries, and J.B. Wyngaarden eds. (Plenum Publishing Corp., New York, NY) pp. 609-619.

Beltinger, C., Fulda, S., Kammertoens, Uckert, W., and Debatin, K.M. (2000). Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis. *Cancer Res.* **60**, 3212-3217.

Beltinger, C., Uckert, W., and Debatin, K.M. (2001). Suicide gene therapy for pediatric patients. *J. Mol. Med.* **78**, 598-612.

Berg, T., Cassel, T.N., Schwarze, P.E., and Nord, M. (2002). Glucocorticoids regulate the CCSP and CYP2B1 promoters via C/EBP beta and delta in lung cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 907-12

Bex, V., Mercier, T., Chaumontet, C., Gaillard-Sanchez, I., Flechon, B., Mazet, F., Traub, O., and Martel, P. (1995). Retinoic acid enhances connexin43 expression at the post-transcriptional level in rat liver epithelial cells. *Cell Biochem. Funct.* **13**, 69-77.

Bigname, G.S., Senter, P.D., Grothaus, P.G., Fisher, K.J., Humphreys, T., and Wallace, P.M. (1992). N-(4'-hydroxyphenylacetyl) palytoxin: a palytoxin prodrug that can be activated by a monoclonal antibody-penicillin G amidase conjugate. *Cancer Res.* **52**, 5759-5764.

Black, M.E. (2001). Enzyme and pathway engineering for suicide gene therapy. *Genet. Eng. (NY)* **23**, 113-127.

Braiden, V., Ohtsuru, A., Kawashita, Y., Miki, F., Sawada, T., Ito, M., Cao, Y., Kaneda, Y., Koji, T., and Yamashita, S. (2000). Eradication of breast cancer xenografts by hyperthermic suicide gene therapy under the control of the heat shock protein promoter. *Hum. Gene Ther.* **11**, 2453-2463.

Brand, K., Bartels, Th., Arnold, W., and Strauss, M. (2001). Regression of large tumors expressing a suicide gene. *Exp. Toxic Pathol.* **53**, 115-121.

Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, J., Moody, P.C.E., Smith, J.L., Tomchick, D.R., and Murzin, A.G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* **378**, 416-419.

Brown, C.H., Stahick, E., and Carbone, P.P. (1970). Clinical efficacy and lack of toxicity of allopurinol (NSC-1390) given intravenously. *Cancer Chemother. Rep.* **54**, 125-129.

Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8033-8037.

Burtscher, H., and Schumacher, G. (1992). Reconstitution *in vivo* of penicillin G acylase activity from separately expressed subunits. *Eur. J. Biochem.* **205**, 77-83.

Byun, J., Kim, S.H., Kim, J.M., Yu, S.S., Robbins, P.D., Yim, J., and Kim, S. (1996). Analysis of the relative level of gene expression from different retroviral vectors used for gene therapy. *Gene Ther.* **3**, 780-788.

Calabretta, B., Skorski, T., Zon, G., Ratajczak, M.Z., and Gewirtz, A.M. (1999). Antisense strategies in the treatment of leukemias. In *Gene Therapy of Cancer; Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp. 223-234.

Calydon Inc. (2001). Scientific abstract/A phase II randomized comparison study of an intraprostatic injection of CV7606 followed by external beam radiotherapy (EBRT) versus EBRT alone in patients with intermediate risk, clinically localized prostate cancer. Office of Biotechnology Activities. National Institutes of Health. Clinical trial report by study phase. URL: <http://www4.od.nih.gov/oba>.

Carystinos, G.D., Katabi, M.M., Laird, D.W., Galipeau, J., Chan, H., Alaoui-Jamali, M.A., and Batist, G. (1999). Cyclic-AMP induction of gap junctional intercellular communication increases bystander effect in suicide gene therapy. *Clin. Cancer Res.* **5**, 61-68.

Casado, E., Nettelbeck, D.M., Gomez-Navarro, J., Hemminki, A., Gonzalez Baron, M., Siegal, G.P., Barnes, M.N., Alvarez, R.D., and Curiel, D.T. (2001). Transcriptional targeting for ovarian cancer gene therapy. *Gynecol. Oncol.* **82**, 229-237.

Center for Disease Control and Prevention. Division of Parasitic Diseases. (1999). Fact sheet/East African trypanosomiasis. URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/trypanosomiasis>.

Cesen-Cummings, K., Warner, K.A., and Ruch R.J. (1998). Role of protein kinase C in the deficient gap junctional intercellular communication of K-ras-transformed murine lung epithelial cells. *Anticancer Res.* **18**, 4343-4346.

Chase, M., Chung, R.Y., and Chiocca, E.A. (1998). An oncolytic viral mutant that delivers the CYP2B1 transgene and augments cyclophosphamide chemotherapy. *Nature Biotechnol.* **16**, 444-448.

Chen, S.H., Shine, H.D., Goodman, R.L., Grossman, S.L.C., and Woo, S.L.C. (1994). Gene therapy for brain tumours: regression of experimental gliomas by adenovirus mediated gene transfer *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3054-3057.

Chen, L., and Waxman, D.J. (1995). Intratumoral activation and enhanced chemotherapeutic effect of oxazaphosphorines following cytochrome P-450 gene transfer: development of a combined chemotherapy/cancer gene therapy strategy. *Cancer Res.* **55**, 581-589.

Chen, L., Waxman, D.J., Chen, D., and Kufe, D.W. (1996). Sensitization of human breast cancer cells to cyclophosphamide and ifosfamide by transfer of a liver cytochrome P450 gene. *Cancer Res.* **56**, 1331-1340.

Choi, K.S., Kim, J.A., and Kang, H.S. (1992). Effects of site-directed mutations on processing and activities of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC11105. *J. Bacteriol.* **174**, 6270-6276.

Connors, T.A. (1995). The choice of prodrugs for gene directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Gene Ther.* **2**, 702-709.

Connors, T.A., and Knox, R.J. (1995). Prodrugs in cancer chemotherapy. *Stem Cells* **13**, 501-511.

Cooper, M.J. (1999). Non-infectious gene transfer and expression systems for cancer gene therapy. In *Gene Therapy of Cancer; Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp. 77-94.

Coulson, J.M., Stanley, J., and Woll, P.J. (1999). Tumour-specific arginine vasopressin promoter activation in small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* **80**, 1935-1944.

Crystal, R.G. (1995). Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* **270**, 404-410.

Culver, K.W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E.H., and Blaese, R.M. (1992). *Science* **256**, 1550-1552.

Deonarain, M.P., and Epenetos, A.A. (1994). Targeting enzymes for cancer therapy: old enzymes in new roles. *Br. J. Cancer* **70**, 786-794.

Deonarain, M.P., Spooner, R.A., and Epenetos, A.A. (1995). Genetic delivery of enzymes for cancer therapy. *Gene Ther.* **2**, 235-244.

Dilber, M.S., and Smith, C.I.E. (1997). Editorial / Suicide genes and bystander killing: local and distant effects. *Gene Ther.* **4**, 273-274.

Driscoll, K.E., Deyo, L.C., Carter, J.M., Howard, B.W., Hassenbein, D.G., and Bertram, T.A. (1997). Effects of particle exposure and particle-elicited inflammatory cells on mutation in rat alveolar epithelial cells. *Carcinogenesis* **18**, 423-430.

Elion, G.B. (1983). The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J. Antimicrob. Chemother.* **12** Suppl B, 9-17.

Ellis, P.A., Saccani-Jotti G., Clarke R., Johnston S.R., Anderson E., Howell A., A'Hern R., Salter J., Detre S., Nicholson R., Robertson J., Smith I.E., and Dowsett M. (1997). Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int. J. Cancer* **72**, 608-613.

Fish, W.R., Marr, J.J., Berens, R.L., Looker, D.L., Nelson, D.J., Lafon, S.W., and Balber, A.E. (1985). Inosine analogs as chemotherapeutic agents for African trypanosomes: metabolism in trypanosomes and efficacy in tissue culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 33-36.

Fox, P.M., Royse-Smith, D., and O'Sullivan, W. J. (1970). Orotidinuria induced by allopurinol. *Science* **168**, 861-862.

Fox, R.M., Woods, R.L., Tattersall, M.H.N., Piper, A.A., and Sampson, D. (1981) Allopurinol modulation of fluorouracil toxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **5**, 151-155.

Frederiksen, K.S., Petri, A., Abrahamsen, N., and Poulsen, H.S. (1999). Gene therapy for lung cancer. *Lung Cancer* **23**, 191-207.

Freeman, S.M., Abboud, C.N., Whartenby, K.A., Packman, C.H., Koeplin, D.S., Moolten, F.L., and Abraham, G.N. (1993). The bystander effect: tumour regression when a fraction of the tumour mass is genetically modified. *Cancer Res.* **53**, 5274-5283.

Freeman, S.M., Ramesh, R., Munshi, A., Whartenby, K.A., Freeman, J.L., and Marrogi, A.J. (1999). *In situ* use of suicide genes for cancer therapy. In *Gene Therapy of Cancer*;

Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp. 155-176.

Galipeau, J., Li, H., Paquin, A., Sicilia, F., Karpati, G., and Nalbantoglu, J. (1999). Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective *in vivo* suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Cancer Res.* **59**, 2384-2394.

Gottschalk, S., Cristiano, R.J., Smith, L., and Woo, S.L. (1994). Folate receptor-mediated DNA delivery and expression *in vitro*. *Gene Ther.* **1**, 185-191.

Graham, S., Day, R.O., Wong, H., McLachlan, A.J., Bergendal, L., Miners, J.O., and Birkett, D.J. (1996). Pharmacodynamics of oxypurinol after administration of allopurinol to healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **41**, 299-304.

Greco, O., and Dachs, G. (2001). Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives. *J. Cell. Physiol.* **187**, 22-36.

Grove, J.I., Searle, P.F., Weedon, S.J., Green, N.K., McNeish, I.A., and Kerr, D.J. (1999). Virus-directed enzyme prodrug therapy using CB1954. *Anticancer Drug Des.* **14**, 461-472.

Gumpert, J., Cron, H., Plapp, R., Niersbach, H., and Hoischen, C. (1996). Synthesis and secretion of recombinant penicillin G acylase in bacterial L-forms. *J. Basic Microbiol.* **36**, 89-98.

Gunji, Y., Ochiai, T., Shimada, H., and Matsubara, H. (2000). Gene therapy for cancer. *Surg. Today* **30**, 967-973.

Gutierrez, A.A., Lemoine, N.R., and Sikora, K. (1992). Gene therapy for cancer. *Lancet* **339**, 715-721.

Gutman, A., and Wasylyk, B. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.* **9**, 2241-6

Hamstra, D.A., Rice, D.J., Fahmy, S., Ross, B.D., and Rehemtulla, A. (1999). Enzyme/prodrug therapy for head and neck cancer using a catalytically superior cytosine deaminase. *Hum. Gene Ther.* **10**, 1993-2003.

Harris, H.L., Batist, G., Belt, R., Rovira, D., Navari, R., Azarnia, N., Welles, L., and Winer, E. (2002). Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer* **94**, 25-36.

Harris, J.D., Gutierrez, A.A., Hurst, H.C., Sikora, K., and Lemoine, N.R. (1994). Gene therapy for cancer using tumour-specific prodrug activation. *Gene Ther.* **1**, 170-175.

Hart, I.R. (1996). Tissue specific promoters in targeting systemically delivered gene therapy. *Semin. Oncol.* **23**, 154-158.

Heine, D., Müller, R., and Brüsselbach, S. (2001). Cell surface display of a lysosomal enzyme for extracellular gene-directed enzyme prodrug therapy. *Gene Ther.* **8**, 1005-1010.

Hochhauser D., Schnieders B., Ercikan-Abali E., Gorlick R., Muise-Helmericks R., Li W.W., Fan J., Banerjee D., and Bertino J.R. (1996). Effect of cyclin D1 overexpression on drug sensitivity in a human fibrosarcoma cell line. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 1269-1275.

Huber, B.E., Richards, C.A., and Krenitsky, T.A. (1991). Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8039-8043.

Huebner, K. Druck, T., Hadaczek, P., McCue, P.A., and Maguire, H.C. (1999). Characterization of specific genetic alterations in cancer cells. In *Gene Therapy of Cancer; Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp. 21-31.

Inase, N., Horita, K., Tanaka, M., Miyake, S., Ichioka, M., and Yoshizawa, Y. (2000). Use of gastrin-releasing peptide promoter for specific expression of thymidine kinase in small-cell lung carcinoma cells. *Int. J. Cancer* **85**, 716-719.

Inase, N., Miyake, S., and Yoshizawa, Y. (2001). Calretinin promoter for suicide gene expression in malignant mesothelioma. *Anticancer Res.* **21**, 1111-1114.

Izquierdo, M., Cortes, M.L., Martin, V., deFelipe, P., Izquierdo, J.M., Perez-Higueras, A., Paz, J.F., Isla, A., and Blazquez, M.G. (1997). Gene therapy in brain tumors: implications of the size of glioblastoma on its curability. *Acta Neurochir. Suppl.* **68**, 111-117.

Jackson, R.C., Morris, H.P., and Weber, G. (1975). Neoplastic transformation-linked alterations in adenylosuccinate synthetase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 526-532.

Jin, X., Shearman, L.P., Wever, D.R., Zylka, M.J., De Vries, G.J., and Reppert, S.M. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* **96**, 57-68.

Kann, H.E., Wells, J.H., Gallelli, J.F., Schien, P.S., Cooney, D.A., Smith, E.R., Seegmiller, J.E., and Carbone, P.P. (1968). The development and use of an intravenous preparation of allopurinol. *Am. J. Med. Sci.* **256**, 53-63.

Karle, P., Renner, M., Salmons, B., and Günzburg, W.H. (2001). Necrotic, rather than apoptotic, cell death caused by cytochrome P450-activated ifosfamide. *Cancer Gene Ther.* **8**, 220-230.

- Karran, P., and Bignami, M. (1996). Drug-related killings: a case of mistaken identity. *Chem. Biol.* **3**, 875-879.
- Kastan, M.B., Canman C.E., and Leonard C.J. (1995). P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **14**, 3-15.
- Katabi, M.M., Chan, H.L., Karp, S.E., and Batist, G. (1999). Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter for gene-targeted therapy differentially expressed and regulated in human cancer cells. *Hum. Gene Ther.* **20**, 155-164.
- Katzung, B.G., and Furst, D.E. (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; disease-modifying antirheumatic drugs; nonopioid analgesics; drugs used in gout. In *Basic and Clinical Pharmacology*, 7th ed. B.G. Katzung, ed. (Appleton & Lange, Stamford, CT) pp. 578-602.
- Kaufmann, W.K., and Paules, R.S. (1996). DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J.* **10**, 238-247.
- Kerr, D.E., Senter, P.D., Burnette, W.V, Hirschberg, D.L, Hellstrom, I., and Hellstrom, K.E. (1990). Antibody-penicillin-V-amidase conjugates kill antigen-positive tumor cells when combined with doxorubicin phenoxycetamide. *Cancer Immunol. Immunother.* **31**, 202-206.
- Kinnula, V.L., Sarnestio, A., Hekkila, L., Toivenen, H., Mattila, S., and Raivio, K.O. (1997). Assessment of xanthine oxidase in human lung and lung transplantation. *Eur. Respir. J.* **10**, 676-680.
- Knox, R.J. (2001). Gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) - recognizing the present limitations of gene therapy for the treatment of cancer. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2**, 835-838.
- Knox, R.J., Friedlos, F., and Boland, M.P. (1993). The bioactivation of CB1954 and its use as a prodrug in antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Cancer Metastasis Rev.* **12**, 195-212.
- Kohn, K.W. (1996). Regulatory genes and drug sensitivity. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 1255-1256.
- Koshikawa, N., Takenaga, K., Tagawa, M., and Sakiyawa, S. (2000). Therapeutic efficacy of the suicide gene driven by the promoter of vascular endothelial growth factor gene against hypoxic tumor cells. *Cancer Res.* **60**, 2936-2941.
- Koyama, K., Kaya, M., Ishigaki, T., Tsujita, J., Hori, S., Seino, T., and Kasugai, A. (1999). Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **80**, 28-33.

- Koyama, F., Sawada, H., Hirao, T., Fujii, H., Hamada, H., and Nakano, H. (2000). Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of *Escherichia coli* cytosine deaminase gene and *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther.* **7**, 1015-1022.
- Krohne, T.U., Shankara, S., Geissler, M., Roberts, B.L., Wands, J.R., Blum, H.E., and Mohr, L. (2001). Mechanisms of cell death induced by suicide genes encoding purine nucleoside phosphorylase and thymidine kinase in human hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *Hepatology* **34**, 511-518.
- Kwong, Y.L., Chen, S.H., Kosai, K., Finegold, M., and Woo, S.L.C. (1997). Combination therapy with suicide and cytokine genes for hepatic metastases of lung cancer. *Chest* **112**, 1332-1337.
- Lai, Z., and Brady, R.O. (2002). Gene transfer into the cerebral nervous system *in vivo* using a recombinant lentivirus vector. *J. Neurosci. Res.* **67**, 363-371.
- Lattime, E.C., Eisenlohr, L.C., Gomella, L.G., and Mastrangelo, M.J. (1999). The use of vaccinia virus vectors for immunotherapy via *in situ* tumor transfection. In *Gene Therapy of Cancer; Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp. 125-137.
- Lee, Y.J., Galoforo, S.S., Battle, P., Lee, H., Corry, P.M., and Jessup, J.M. (2001). Replicating adenoviral vector-mediated transfer of a heat-inducible double suicide gene for gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **8**, 397-404.
- Lewin, B. (1997). Retroviruses and retroposons. In *Genes*, 6th ed. B. Lewin, ed. (Oxford University Press and Cell Press, Oxford, England) pp. 599-619.
- Logg, C.R., Tai, C.K., Logg, A., Anderson, W.F., and Kasahara, N. (2001). A uniquely stable replication-competent retrovirus vector achieves efficient gene delivery *in vitro* and in solid tumors. *Hum. Gene Ther.* **12**, 921-932.
- Löhr, M., Müller, P., Karle, P., Stange, J., Mitzner, S., Jesnowski, R., Nizze, H., Nebe, B., Liebe, S., Salmons, B., and Günzburg, W.H. (1998). Targeted chemotherapy by intratumour injection of encapsulated cells engineered to produce CYP2B1, an ifosfamide activating cytochrome P450. *Gene Ther.* **5**, 1070-1078.
- Lorenzini, L., De Martino, A., Testi, W., Sorbellini, F., Dispensa, E., Tabucchi, A., Carlucci, F. and Rossi, F. (1994). Behavior of enzymes involved in purine nucleotide metabolism in tumors. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, A. Sahota and M. Taylor, eds., (Plenum Press, New York, NY) pp. 213-218.
- Malkki, M., Laakso, M., and Deeb, S.S. (1997). The human hexokinase II gene promoter: functional characterization and detection of variants among patients with NIDDM. *Diabetologia* **40**, 1461-1469.

- Mar, E.C., Chiou, J.F., Cheng, Y.C., and Huang, E.S. (1985). Human cytomegalovirus-induced DNA polymerase and its interaction with the triphosphates of 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinofuranosyl)-5-methyluracil, -5-iodocytosine, and -5-methylcytosine. *J. Virol.* **56**, 846-851.
- Marais, R., Spooner, R.A., Light, Y., Martin, J., and Springer, C.J. (1996). Gene-directed enzyme prodrug therapy with a mustard prodrug/carboxypeptidase G2 combination. *Cancer Res.* **56**, 4735-4742.
- Marr, J.J., and Berens, R.L. (1983). Pyrazolopyrimidine metabolism in the pathogenic *trypanosomatidae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **7**, 339-356.
- Marr, J.J., Berens, R.L., and Nelson, D.J. (1978). Antitrypanosomal effect of allopurinol: conversion in vivo to aminopyrazolopyrimidine nucleotides by *Trypanosoma cruzi*. *Science* **201**, 1018-1020.
- Martinet, O., Vallet, C., and Mosimann, F. (2001). Thérapie génique et cancer. *Rev. Med. Suisse Romande* **121**, 113-117.
- Martinez, S., and Marr, J.J. (1992). Allopurinol in the treatment of american cutaneous leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* **326**, 741-744.
- Martz, D., Rayos, G., Schielke, G.P., and Betz, A.L. (1989). Allopurinol and dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* **20**, 488-494.
- Mastromarino, P., Conti, C., Goldoni, P., Hauttecoeur, B., and Orsi, N. (1987). Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. *J. Gen. Virol.* **68**, 2359-2369.
- Mathupala, S.P., Rempel, A., and Pedersen, P.L. (1995). Glucose catabolism in cancer cells. Isolation, sequence, and activity of the promoter for type II hexokinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 16918-16925.
- Mathupala, S.P., Rempel, A., and Pedersen, P.L. (2001). Glucose catabolism in cancer cells. Identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J. Biol. Chem.* **276**, 43407-43412.
- Matton, D.P. (1997). Biologie moléculaire BIO 2101. Notes de cours et figures. Université de Montréal, Institut de recherche en biologie végétale. pp.118-146.
- McNeish, I.A., Searle, P.F., Young, L.S., and Kerr, D.J. (1997). Gene directed enzyme prodrug therapy for cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **26**, 173-184.
- Medical Economics Co. (2001). Aloprim (allopurinol sodium). In *Physician's Desk Reference*. 55th ed. (Medical Economics Co., Montvale, NJ) pp. 2128-2130.

- Meng, R.D., and El-Deiry, W.S. (1999). Tumor suppressor genes as targets for cancer gene therapy. In *Gene Therapy of Cancer; Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp. 3-20.
- Miller, N., and Whelan, J. (1997). Progress in transcriptionally targeted and regulatable vectors for genetic therapy. *Hum. Gene Ther.* **8**, 803-815.
- Momparler, R.L., Côté, S., and Eliopoulos, N. (1997). Pharmacological approach for optimization of the dose schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) for the therapy of leukemia. *Leukemia* **11**, 175-180.
- Moolten F.L. (1996). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* **46**, 5276-5281.
- Mroz, P.J., and Moolten, F.L. (1993). Retrovirally transduced *Escherichia coli gpt* genes combine selectability with chemosensitivity capable of mediating tumor eradication *Hum. Gene Ther.* **4**, 589-595.
- Mullen, C.A. (1999). Cytosine deaminase as a suicide gene in cancer gene therapy. In *Gene Therapy of Cancer; Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp. 201-208.
- Mullen, C.A., Kilstrup, M., and Blaese, R.M. (1992). Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 33-37.
- Mulligan, R.C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* **260**, 926-932.
- Murrell, G.A.C., and Rapeport, W.G. (1986). Clinical pharmacokinetics of allopurinol. *Clin. Pharmacokinet.* **11**, 343-353.
- Nakashima, R.A., Paggi, M.G., and Pedersen, P.L. (1984). Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells. *Cancer Res.* **44**, 5702-5706.
- Nelson, D.J., Bugge, C.J.L., Elion, G.B., Berens, R.L., and Marr, J.J. (1979). Metabolism of pyrazolo (3,4-*d*) pyrimidines in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **254**, 3959-3964.
- Nelson, W.G., and Kastan, M.B. (1994). DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1815-1823.
- Nettelbeck, D.M., Jérôme, V., and Müller, R. (2000). Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. *Trends Genet.* **16**, 174-181.

Niculescu-Duvaz, I., and Springer, C.J. (1997). Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **26**, 151-172.

Nishikawa, M., and Huang, L. (2001). Nonviral vectors in the new millenium: delivery barriers in gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **12**, 861-870.

Nygren, P. (2001). What is cancer chemotherapy? *Acta Oncol.* **40**, 166-174.

O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., Friend, S., Fornace, A.J. Jr, and Kohn, K.W. (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* **57**, 4285-4300.

Office of Biotechnology Activities. National Institutes of Health. (2002). Recombinant DNA and gene transfer. Clinical trial report by study phase. URL: <http://www4.od.nih.gov/oba>.

Oh, S., Kim, T., Park, Y., Min, S., Kim, I., and Kang, H. (1987). Complete nucleotide sequence of the penicillin G acylase gene and the flanking regions, and its expression in *Escherichia coli*. *Gene* **56**, 87-97.

Ohzeki, S., Tachibana, A., Tatsumi, K., and Kato, T. (1997). Spectra of spontaneous mutations at the hprt locus in colorectal carcinoma cell lines defective in mismatch repair. *Carcinogenesis* **18**, 1127-1133.

Ono, Y., Ikeda, K., Wei, M.X., Harsh IV, G.R., Tamiya, T., and Chiocca, E.A. (1997). Regression of experimental brain tumors with 6-thioxanthine and *Escherichia coli gpt* gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **8**, 2043-2055.

Ory, D.S., Neugeboren, B.A., and Mulligan, R.C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11400-11406.

Osaki, T., Tanio, Y., Tachibana, I., Hosoe, S., Kumagai, T., Kawase, I., Oikawa, K., and Kishimoto, T. (1994). Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Res.* **54**, 5258-5261.

Park, J.Y., Elshami, A.A., Amin, K., Rizk, N., Kaiser, L.R., and Albelda, S.M. (1997). Retinoids augment the bystander effect in vitro and in vivo in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated gene therapy. *Gene Ther.* **4**, 909-917.

Pataer, A., Smythe, W.R., Yu, R., Fang, B., McDonnell, T., Roth, J.A., and Swisher, S.G. (2001). Adenovirus-mediated Bak gene transfer induces apoptosis in mesothelioma cell lines. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **121**, 61-67.

- Paterson, J., Uriel, C., Egron, M.J., Herscovici, J., Antonakis, K., and Alaoui-Jamali, M.A. (1998). Antiproliferative and apoptotic activities of ketonucleosides and keto-C-glycosides against non-small-cell lung cancer cells with intrinsic drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 779-784.
- Péron, J.M., Shurin, M.R., and Lotze, M.T. (1999). Cytokine gene therapy of cancer. In *Gene Therapy of Cancer; Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp. 359-371.
- Poland, B.W., Silva, M.M., Serra, M.A., Cho, Y., Kim, K.H., Harris, E.M.S., and Honzatko, R.B. (1993). Crystal structure of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 25334-25342.
- Powell, S.M., Zalkin, H., and Dixon, J.E. (1992). Cloning and characterization of the cDNA encoding human adenylosuccinate synthetase. *FEBS Lett.* **303**, 4-10.
- Puhlmann, M., Gnant, M., Brown, C.K., Alexander, H.R., and Bartlett, D.L. (1999). Thymidine kinase-deleted vaccinia virus expressing purine nucleoside phosphorylase as a vector for tumor-directed gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **10**, 649-657.
- Ram, Z., Culver, K.W., Oshiro, E.M., Viola, J.J., DeVroom, H.L., Otto, E., Long, Z., Chiang, Y., McGarrity, G.J., Muul, L.M., Katz, D., Blaese, R.M., and Oldfield, E.H. (1997). Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat. Med.* **3**, 1354-1361.
- Ram, Z., Culver, K.W., Walbridge, S., Blaese, R.M., and Oldfield, E.H. (1993). *In situ* retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res.* **53**, 83-88.
- Reed, J.C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**, 773-776.
- Reuter, C.W.M., Morgan, M.A., and Bergman, L. (2000). Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* **96**, 1655-1669.
- Reynolds, P.N., Nicklin, S.A., Kaliberova, L., Boatman, B.G., Grizzle, W.E., Balyasnikova, I.V., Baker, A.H., Danilov, S.M., and Curiel, D.T. (2001). Combined transductional and transcriptional targeting improves the specificity of transgene expression *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* **19**, 838-842.
- Riley, D.J., Nikitin, A.Y., and Lee, W.H. (1996). Adenovirus-mediated retinoblastoma gene therapy suppresses spontaneous pituitary melanotroph in Rb +/- mice. *Nat. Med.* **2**, 1316-1321.
- Rohdewohld, H., Weiher, H., Reik, W., Jaenisch, R., and Breindl, M. (1987). Retrovirus integration and chromatin structure: Moloney murine leukemia proviral integration sites map near DNase I-hypersensitive sites. *J. Virol.* **61**, 336-343.

Roth, J.A. (1996). Modification of tumor suppressor gene expression and induction of apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) with an adenovirus vector expressing wild type p53 and cisplatin. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1013-1030.

Roth, J.A., and Cristiano, R.J. (1997). Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 21-39.

Roth, J.A., Grammer, S.F., Swisher, S.G., Komaki, R., Nemunaitis, J., Merritt, J., Fujiwara, T., and Meyn, R.E. (2001). Gene therapy approaches for the management of non-small cell lung cancer. *Semin. Oncol.* **28**, 50-56.

Roth, J.A., Nguyen, D., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., Ferson, D.Z., Hong, W.K., Komaki, R., Lee, J.J., Nesbitt, J.C., Pisters, K.M., Putnam, J.B., Schea, R., Shin, D.M., Walsh, G.L., Dolormente, M.M., Han, C.I., Martin, F.D., Yen, N., Xu, K., Stephens, L.C., McDonnell, T.J., Mukhopadhyay, T., and Cai D. (1996). Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat. Med.* **2**, 985-991.

Ruch, R.J., Madhukar, B.V., Trosko, J.E., and Klaunig, J.E. (1993). Reversal of ras-induced inhibition of gap-junctional intercellular communication, transformation, and tumorigenesis by lovastatin. *Mol. Carcinog.* **7**, 50-59.

Rundles, R.W. (1985). The development of allopurinol. *Arch. Intern. Med.* **145**, 1492-1503.

Sakai, Y., Kaneko, S., Sato, Y., Kanegae, Y., Tamaoki, T., Saito, I., and Kobayashi, K. (2001). Gene therapy for hepatocellular carcinoma using two recombinant adenovirus vectors with α -fetoprotein promoter and Cre/lox P system. *J. Virol. Methods* **92**, 5-17.

Sakakura, C., Sweeney, E.A., Shirahama, T., Igarashi, Y., Hakomori, S., Tsujimoto, H., Imanishi, T., Ogaki, M., Ohyama, T., Yamazaki, J., Hagiwara, A., Yamaguchi, T., Sawai, K., and Takahashi, T. (1997). Overexpression of Bax sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and etoposide. *Surg. Today*, **27**, 676-679.

Salmon, P., Arrighi, J.F., Piguet, V., Chapuis, B., Zubler, R.H., Trono, D., and Kindler, V. (2001). Transduction of CD34+ cells with lentiviral vectors enables the production of large quantities of transgene-expressing immature and mature dendritic cells. *J. Gene Med.* **3**, 11-20.

Salmon, P., Kindler, V., Ducrey, O., Chapuis, B., Zubler, R.H., and Trono, D. (2000). High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood* **15**, 3392-3398.

Salmon, S.E., and Sartorelli, A.C. (1998). Cancer Chemotherapy. In *Basic and Clinical Pharmacology*. 7th ed. B.G. Katzung, ed. (Appleton & Lange, Stamford, CT) pp. 881-915.

Schatzlein, A.G. (2001). Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress. *Anticancer Drugs* **12**, 275-304.

Schlegel, R., Willingham, M.C., and Pastan, I.H. (1982). Saturable binding sites for vesicular stomatitis virus on the surface of Vero cells. *J. Virol.* **43**, 871-875.

Schrewe, H., Thompson, J., Bona, M., Hefta, L.J., Maruya, A., Hassauer, M., Shively, J.E., Von Kleist, S., and Zimmermann, W. (1990). Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2738-2748.

Schumacher, G., Sizmann, D., Haug, H., Buckel, P., and Böck, A. (1986). Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene - protein relation. *Nucleic Acids Res.* **14**, 5713-5727.

Schwartz, P.M., and Handschumacher, R.E. (1979). Selective antagonism of 5-fluorouracil cytotoxicity by 4-hydroxypyrazolopyrimidine (allopurinol) in vitro. *Cancer Res.* **39**, 3095-3101.

Shapiro, T.A., Were, J.B., Danso, K., Nelson, D.J., Desjardins, R.E., and Pamplin, C.L. (1991). Pharmacokinetics and metabolism of allopurinol riboside. *Clin. Pharmacol. Ther.* **49**, 506-514.

Simonian, P.L., Grillot D.A., and Nunez G. (1997). Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood* **90**, 1208-1216.

Simons, J.W., Baccala, A.A., and Lida, Y. (1999). *Ex vivo* and *in vivo* cytoreductive gene therapy for urologic cancers: translocation of molecular pharmacology to clinical pharmacology. In *Gene Therapy of Cancer; Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp.333-346.

Slack, M., Jacobs, A., Genutt, P., Hartung, M., and Heiss, W.D. (1999). Construction and functional evaluation of double-gene expression cassettes utilising the HSV-1-tk and gfp genes. *J. Gene Med.* **1**, S55.

Smythe, W.R. (2000). Prodrug/drug sensitivity gene therapy: current status. *Curr. Oncol. Rep.* **2**, 17-22.

Spector, T., Berens, R.L., and Marr, J.J. (1982). Adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 225-229.

Spector, T., Jones, T.E., LaFon, S.W., Nelson, D.J., Berens, R.L., and Marr, J.J. (1984). Monophosphates of formycin B and allopurinol riboside. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1611-1617.

Spencer, D.M. (2000). Developments in suicide genes for preclinical and clinical applications. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2**, 433-440.

Spooner, R.A., Martin, J., Friedlos, F., Marais, R., and Springer, C.J. (2000). In suicide gene therapy, the site of subcellular localization of the activating enzyme is more important than the rate at which it activates prodrug. *Cancer Gene Ther.* **7**, 1348-1356.

Spooner, R.A., Maycroft, K.A., Paterson, H., Friedlos, F., Springer, C.J., and Marais, R. (2001). Appropriate subcellular localisation of prodrug-activating enzymes has important consequences for suicide gene therapy. *Int. J. Cancer* **93**, 123-130.

Springer, C.J., and Niculescu-Duvaz, I. (2000a) Approaches to gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT). In *Cancer Gene Therapy; Past Achievements and Future Challenges*. N.A. Habib, ed. (Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, NY) pp. 403-409.

Springer, C.J., and Niculescu-Duvaz, I. (2000b). Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J. Clin. Invest.* **105**, 1161-1167.

Sriubolmas, N., Panbangred, W., Sriurairatana, S., and Meevootisom, V. (1997). Localization and characterization of inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing penicillin G acylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 373-378.

Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 217-245.

Swann, P.F., Waters, T.R., Moulton, D.C., Xu, Y.Z., Zheng, Q., Edwards, M., and Mace, R. (1996). Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* **273**, 1109-1111.

Swisher, S.G., and Roth, M.D. (2000). Gene therapy in lung cancer. *Curr. Oncol. Rep.* **2**, 64-70.

Swisher, S.G., Roth, J.A., Nemunaitis, J., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., Connors, D.G., El-Naggar, A.K., Fossella, F., Glisson, B.S., Hong, W.K., Khuri, F.R., Kurie, J.M., Lee, J.J., Lee, J.S., Mack, M., Merritt, J.A., Nguyen, D.M., Nesbitt, J.C., Perez-Soler, R., Pisters, K.M., Putnam, J.B. Jr, Richli, W.R., Savin, M., Schrupp, D.S., Shin, D.M., Shulkin, A., Walsh, G.L., Wait, J., Weill, D., and Waugh, M.K. (1999). Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 763-771.

The Journal of Gene Medicine (2001). Gene therapy clinical trials. URL: <http://www.wiley.co.uk/genmed>.

Theocharis, S., Kanelli, H., Politi, E., Margeli, A., Karkandaris C., Philippides, T., and Koutselinis, A. (2002). Expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma in non-small cell lung carcinoma: correlation with histological type and grade. *Lung Cancer* **36**, 249-255.

Thomas, G., Feldman, S., and Kramer, W.G. (1982). Interaction of allopurinol with human blood. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 1937-1940.

Trosko, J.E., and Chang, C.C. (2001). Mechanism of up-regulated gap junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. *Mutat. Res.* **480-481**, 219-229.

Tuttle, J.V., and Krenitsky, T.A. (1980). Purine phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **255**, 909-916.

Vaccaro, D.E. (2000). Symbiosis therapy: the potential of using human protozoa for molecular therapy. *Mol. Ther.* **2**, 535-538.

Valle, F., Babas, P., Merino, E., and Bolivar, F. (1991). The role of penicillin amidases in nature and in industry. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 36-40.

Varda-Bloom, N., Shaish, A., Gonen, A., Levanon, K., Greenbereger, S., Ferber, S., Levkovitz, H., Castel, D., Goldberg, I., Afek, A., Kopolovitch, Y., and Harats, D. (2001). Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. *Gene Ther.* **8**, 819-827.

Vaulont, S., and Kahn, A. (1994). Transcriptional control of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J.* **8**, 28-35

Virden, R. (1990). Structure, processing and catalytic action of penicillin acylase. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **8**, 189-218.

Vrudhula, V.M., Senter, P.D., Fischer, K.J., and Wallace, P.M. (1993). Prodrugs of doxorubicin and melphalan and their activation by a monoclonal antibody-penicillin G amidase conjugate. *J. Med. Chem.* **36**, 919-923.

Wallace, H., Clarke, A.R., Harrison, D.J., Hooper, M.L., and Bishop, J.O. (1996). Ganciclovir-induced ablation of non-proliferating thyrocytes expressing herpes virus thymidine kinase occurs by p53-independent apoptosis. *Oncogene* **13**, 55-61.

Wang, C.C. (1998). Basic principles of antiparasitic chemotherapy. In *Basic and Clinical Pharmacology*, 7th ed., B.G. Katzung, ed. (Appleton & Lange, Stamford, CT) pp. 827-837.

Weyel, D., Sedlacek, H.H., Müller, R., and Brüsselbach, S. (2000). Secreted human β -glucuronidase: a novel tool for gene-directed enzyme prodrug therapy. *Gene Ther.* **7**, 224-231.

Wong, K.K., Shaugnessy, E., Lu, D., Fisher-Adams, G., and Chatterjee, S. (1999). Parvovirus vectors for the gene therapy of cancer. In *Gene Therapy of Cancer; Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. E.C. Lattime and S.L. Gerson, eds. (Academic Press, San Diego, CA) pp. 95-111.

Woolley, P.V., Ayoob, M.J., Smith, F.P., Lokey, J.L., DeGreen, P., Marantz, A., and Schein, P.S. (1985). A controlled trial of the effect of 4-hydroxypyrazolopyrimidine (allopurinol) on the toxicity of a single bolus dose of 5-fluorouracil. *J. Clin. Oncol.* **3**, 103-109.

Xiao, X., Samulski, R.J., and Li, J. (1996). Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J. Virol.* **70**, 8098-8108.

Yamaguchi, K., Abe, K., Kameya, T., Adachi, I., Taguchi, S., Otsubo, K., and Yanaihara, N. (1983). Production and molecular size heterogeneity of immunoreactive gastrin-releasing peptide in fetal and adult lungs and primary lung tumors. *Cancer Res.* **43**, 3932-3939.

Zheng, H., Johansson, M., and Karlsson, A. (2001). Bystander effects of cancer cell lines transduced with the multisubstrate deoxyribonucleoside kinase of *Drosophila melanogaster* and synergistic enhancement by hydroxyurea. *Mol. Pharmacol.* **60**, 262-266.

Zimm, S., Collins, J.M., O'Neill, D., Chabner, B.A., and Poplack, D.G. (1983). Inhibition of first-pass metabolism in cancer chemotherapy: interaction of 6-mercaptopurine and allopurinol. *Clin. Pharmacol. Ther.* **34**, 810-817.

ANNEXE 1:

EXPÉRIENCES EN SUPPLÉMENT

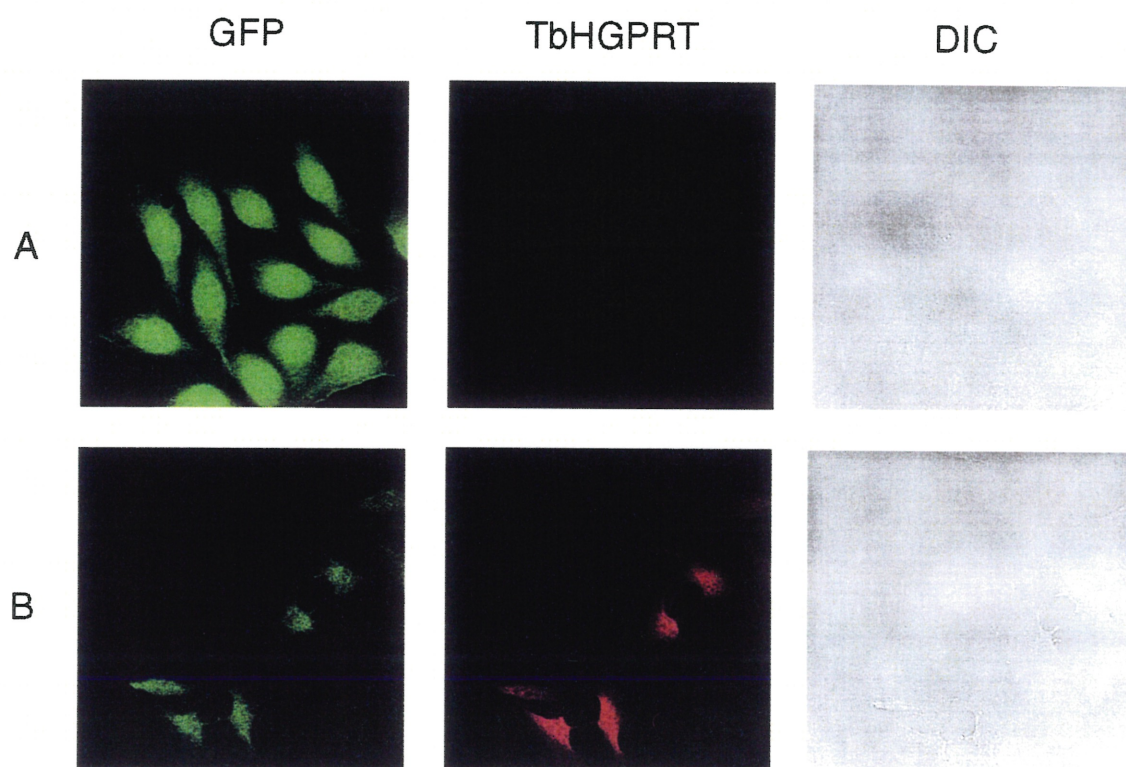


Figure A.1 Localisation cellulaire (cytoplasmique diffuse) de la protéine TbHGPRT (en rouge) dans les cellules DA3 (immunochimie). Les cellules sont transduites avec le rétrovecteur vide (AP2) en (A), ou avec le même vecteur contenant TbHGPRT en (B). GFP, green fluorescent protein; DIC, differential interference channel. L'analyse a été faite à l'aide d'un microscope confocal (grossissement 63x).

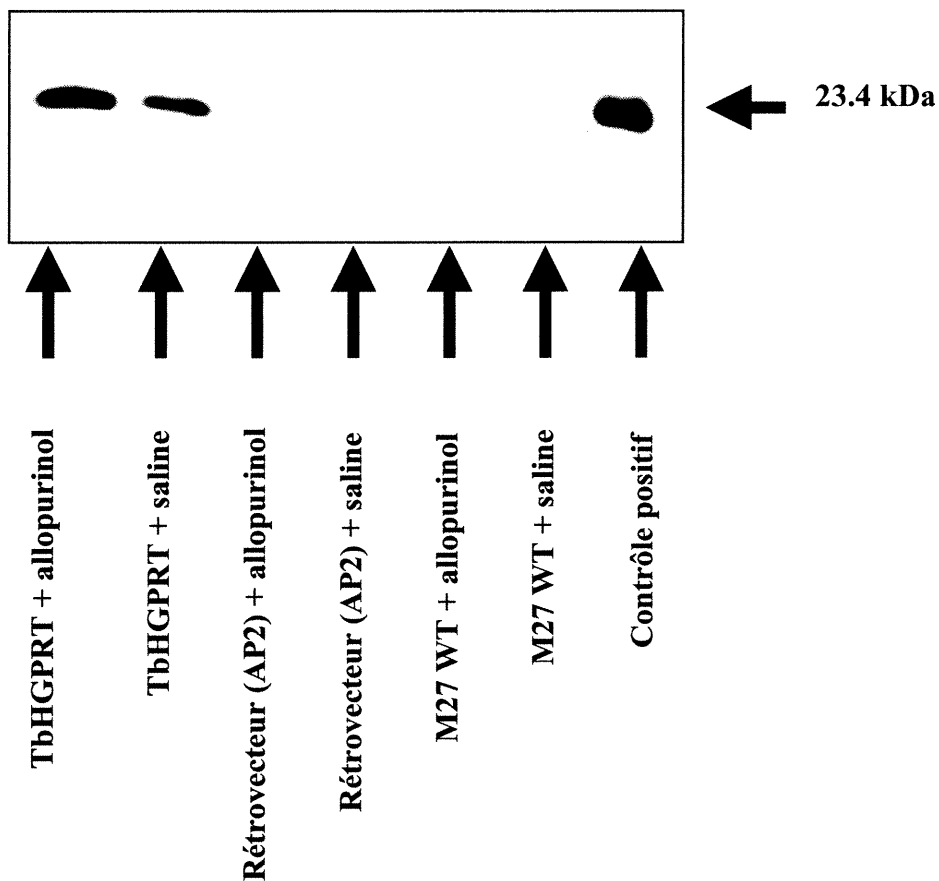


Figure A.2 Confirmation de l'expression de la protéine TbHGPRT chez la souris C57BL/6, par transfert de type Western (extraits de tumeurs, 100 μ g).

Les souris ont été injectées SC avec les cellules M27 WT, les cellules M27 transduites avec le rétrovecteur vide (AP2), ou avec le même vecteur contenant l'ADNc pour TbHGPRT. Le traitement indiqué a été administré IP pendant 3 à 4 semaines, à raison de 100 mg/kg/jour pour l'allopurinol. La masse moléculaire de TbHGPRT est indiquée par la flèche (23.4 kDa, selon Allen et Ullman, 1993).

ANNEXE 2:

IMPLICATION DE LA CANDIDATE

DANS LES TRAVAUX PRÉSENTÉS

Article 1: A Study on the Expression of Penicillin G Amidase to Activate a Doxorubicin Prodrug

Ordre des auteurs

Caroline Trudeau, Naciba Benlimame, Ala-Eddin Al Moustafa, Jacques Galipeau, Moulay A. Alaoui-Jamali, Prabhat Arya et Gérald Batist.

Contribution de la candidate

Caroline Trudeau a préparé toutes les cultures cellulaires *in vitro*, (préparation de lignées stables par transfection, production/concentration de particules rétrovirales et transduction des cellules cibles, transfections transitoires), et a exécuté les expériences utilisant des techniques de biologie moléculaire (sous-clonages dans des vecteurs rétroviraux et plasmidiques, transferts de type Western et Northern, immunoprécipitation, co-immunoprécipitation, RT-PCR), ainsi que l'étalement des cellules et leur préparation pour l'immunochimie et les essais de cytotoxicité *in vitro*. Elle a entièrement rédigé l'article.

Rôle des coauteurs

Dr Benlimame a aidé à mettre au point une technique d'immunochimie et a contribué à l'analyse microscopique.

Dr Ala-Eddin Al Moustafa a suggéré quelques stratégies (immunoprécipitation et RT-PCR).

Dr Galipeau a suggéré certaines des stratégies de sous-clonage dans le vecteur rétroviral.

Dr Alaoui-Jamali a fait les contacts avec le chercheur qui a synthétisé le promédicament et il a révisé l'article afin de le soumettre à la revue scientifique.

Dr Prabhat Arya a contribué à la synthèse du promédicament, aux essais HPLC et MS, ainsi qu'à la rédaction du paragraphe sur cette synthèse dans la section «*Materials and Methods*» de l'article.

Dr Batist est le directeur de recherche et a révisé l'article afin de le soumettre à la revue scientifique.

Article 2: A Novel Parasite-Derived Suicide Gene for Cancer Gene Therapy with Specificity for Lung Cancer Cells

Ordre des auteurs

Caroline Trudeau, Shala Yuan, Jacques Galipeau, Naciba Benlimame, Moulay A. Alaoui-Jamali et Gérald Batist.

Contribution de la candidate

Caroline Trudeau a préparé toutes les cultures cellulaires *in vitro*, (préparation de lignées stables par transfection, production/concentration de particules rétrovirales et transduction des cellules cibles), a exécuté les expériences utilisant des techniques de biologie moléculaire (sous-clonage dans un vecteur rétroviral, transferts de type Western), ainsi que les essais de cytotoxicité *in vitro*, d'apoptose et d'accumulation (*uptake*) du promédicament. Elle a aussi fait l'étalement des cellules et leur préparation pour l'immunochimie. Elle a entièrement rédigé l'article.

Rôle des coauteurs

Madame Yuan a assisté dans la préparation de certains des échantillons pour les essais d'accumulation du promédicament et a préparé quelques gels pour les transferts de type Western.

Dr Galipeau a fourni le vecteur de type rétroviral.

Dr Benlimame a aidé à mettre au point une technique d'immunochimie et a contribué à l'analyse microscopique.

Dr Alaoui-Jamali et Dr Batist, le directeur de recherche, ont révisé l'article afin de le soumettre à la revue scientifique.

Article 3: Genomic Cloning of the 5' Region of the Adenylosuccinate Synthetase

Gene of *Trypanosoma brucei*

Contribution de la candidate

Caroline Trudeau a fait le criblage d'une librairie d'ADN génomique afin d'extraire plusieurs clones contenant des fragments du gène en question, grâce à des techniques de biologie moléculaire (marquage radioactif de sondes, analyses de l'ADN avec des endonucléases de restriction), et les travaux de microbiologie (préparation de divers milieux de culture, de cultures bactériennes et de l'excision des phages). Elle a fait les analyses qui requièrent des programmes informatiques spécialisés et a rédigé tout l'article.

Article 4: A Study of the Specificity of the Hexokinase Type II Promoter for

Cancer Cells

Ordre des auteurs

Caroline Trudeau, Shala Yuan, George D. Carystinos et Gérald Batist.

Contribution de la candidate

Caroline Trudeau a contribué à la production de divers fragments du promoteur à l'aide de techniques de biologie moléculaire (sous-clonages dans des vecteurs d'expression, digestion de l'ADN avec des endonucléases de restriction); elle a fait des transfections transitoires dans différentes lignées cellulaires et des essais à l'aide du gène rapporteur

luciférase afin d'analyser les fragments. Elle a compilé, analysé et présenté tous les résultats des essais de luciférase. Elle a entièrement rédigé le résumé et l'article.

Rôle des coauteurs

Madame Yuan a aussi contribué à la production de divers fragments du promoteur à l'aide de techniques de biologie moléculaire; elle a fait des transfections transitoires *in vitro* et des essais à l'aide du gène rapporteur luciférase afin d'analyser les fragments.

Dr Carystinos a exécuté les essais de retard sur gel à partir de certains fragments du promoteur.

Dr Batist est le directeur de recherche et a révisé le résumé avant la soumission.

Annexe 1: Expériences en supplément

Figure A.1: Caroline Trudeau a exécuté la technique d'immunochimie.

Figure A.2: Caroline Trudeau a rédigé le protocole expérimental, a fait environ 75% du travail avec les animaux de laboratoire (préparation de la drogue, administration de la drogue, recueil et conservation des spécimens), et le transfert de type Western.

