

INTERFERONS, FACTEURS DE CROISSANCE ET SARCOLECTINES COMME REGULATEURS DE LA CROISSANCE COORDONNEE DES CELLULES. REVERSION STABLE DES CELLULES CANCEREUSES A L'ETAT NON MALIN*

par Ch. CHANY**

RESUME Le système interféron est hétérogène et composé d'une grande variété de molécules alpha, une bêta et une gamma. Le grand nombre de types divers pourrait refléter le caractère complexe de leurs fonctions biologiques. Nous suggérons que le rôle le plus important des interférons pourrait être la régulation de la croissance coordonnée des cellules. Cette hypothèse est basée sur les observations suivantes : premièrement, interférons, facteurs de croissance et des antagonistes des fonctions biologiques de l'interféron désignés par le nom de sarcolectins, sont constamment présents dans le placenta pendant toute la durée de la phase fœtale de la grossesse. Ces interférons peuvent agir comme des régulateurs négatifs de rétro-inhibition des facteurs de croissance. A leur tour, les sarcolectins inhibent l'effet de l'interféron. En parallèle, les interférons peuvent inhiber l'expression de proto-oncogènes. Deuxièmement, nous avons observé que dans certains cas, un traitement prolongé des cellules cancéreuses peut affecter l'expression de certains oncogènes (*v-mos*), ce qui a pour résultat une réversion des cellules à un état non-malin, qui persiste même lorsqu'on enlève l'interféron du milieu de culture. Ces cellules ne sont plus capables d'induire des tumeurs dans les souris «nude». Le présent modèle pourrait être appliqué dans certains cas pour développer des protocoles de traitement anti-tumoraux, même chez des malades. Cette possibilité est suggérée par la sensibilité des tricholeucémies au traitement prolongé par l'interféron.

Mots-clés : Interférons — Facteurs de croissance — Sarcolectines

Les interférons ont été décrits à l'origine comme des substances antivirales. Les progrès obtenus depuis trente ans dans leur connaissance suggèrent que leur rôle biologique est plus complexe que ne le laissent prévoir les observations d'origine.

Les arguments que nous allons développer démontrent, qu'en plus de l'effet antiviral, les fonctions les plus importantes des interférons pourraient être la régulation de la croissance coordonnée des cellules et la protection du génome cellulaire contre l'intégration des DNA étrangers. Les interférons n'agissent pas directement sur les cellu-

les ; comme d'autres médiateurs protéiques, leur action nécessite l'intégrité de récepteurs qui, dans le cas présent, sont de nature protéinique et associés à la membrane cellulaire. Ces récepteurs sont spécifiques de l'interféron et aussi de l'espèce cellulaire, ce qui explique pourquoi seules les cellules homologues sont sensibles à son action. Les signaux chimiques produits par les cellules après association interféron-récepteur sont transmis et amplifiés et aboutissent à la synthèse dans le cytosole de protéines secondaires (protéine kinase 2-5A synthétase, etc . . .), qui sont directement responsables de l'expression de ses différentes fonctions. L'état antiviral ainsi obtenu est transitoire et la cellule au bout d'un certain temps, retrouve son état initial avec réapparition de la sensibilité aux virus. L'intégrité physique et physiologique des récepteurs est une condition majeure pour le fonctionnement du système interféron. Dans certaines conditions pathologiques, en particulier

*Communication présentée au XXXVe Congrès de la Société de Pathologie infectieuse de Langue française, à Paris, le 4 décembre 1987, sur le thème « Les infections virales : Actualités »

**Hôpital Saint Vincent de Paul, 74 avenue Denfert-Rochereau, F-75014 Paris

au cours de transformations malignes, des cellules perdent leur capacité de répondre à l'interféron en raison de la dégradation du cytosquelette et de la matrice-extracellulaire. Au cours des traitements la faible sensibilité des cellules malignes à l'IFN, explique au moins en partie, les difficultés rencontrées dans l'utilisation de cette substance (1).

PRESENCE D'INTERFERON PENDANT LA VIE FOETALE

La synthèse des interférons est réprimée dans la cellule. A côté des virus, une grande variété d'antigènes divers est capable d'induire leur synthèse. La seule circonstance physiologique actuellement connue au cours de laquelle l'interféron peut être détecté continuellement dans les tissus est la période foetale de la grossesse. On a également détecté l'interféron dans le placenta de souris et de rats gravides (2, 3, 4). La localisation tissulaire de la synthèse de ces interférons n'est pas connue, il semble cependant qu'ils soient fabriqués dans le placenta et excrétés ensuite dans le sang foetal et dans le liquide amniotique. Il convient d'insister sur le fait que la présence de l'interféron est limitée à la cavité foetale et que cette substance n'est pas détectée dans le sang circulant de la mère.

L'analyse des propriétés physico-chimiques et antigéniques de ces IFNs d'origine locale montre :

- 1) qu'ils appartiennent aux types alpha ou beta; l'IFN gamma n'a pas été jusqu'à présent détecté ;
- 2) les IFNs alpha sont de grande diversité antigénique et structurale car leurs poids moléculaires varient entre 15 Kd, 21 Kd, 26 Kd, 40 Kd, 80 Kd. Il est vraisemblable que certains de ces IFNs soient comparables à ceux qui sont présents dans le sang circulant, alors que d'autres, en particulier, de poids moléculaire plus élevé, pourraient être plus spécifiques du tissu foetal ;
- 3) la quantité d'IFN est très faible, souvent à la limite de la détection et fréquemment masquée par la présence de facteurs de croissance ou de sarcolectine synthétisés en même temps et qui, par leur action antagoniste, peuvent masquer leur présence.

SUBSTANCES QUI INHIBENT L'EFFET BIOLOGIQUE DES INTERFERONS, FACTEUR DE CROISSANCE ET SARCOLECTINE

Comme indiqué précédemment, les effets biologiques de l'IFN habituellement mesurés par l'ef-

fet antiviral sont transitoires avec nécessité pour la cellule de restaurer l'état initial. Les facteurs de croissance peuvent interagir dans le sens opposé, avec les interférons. Par exemple le facteur de croissance plaquettaire (PDGF) peut entraver la synthèse d'IFN ou l'effet antiviral qu'il induit (5). On a également noté une diminution de l'affinité du facteur de croissance épithélial (EGF) pour ses propres récepteurs après traitement par l'IFN (6). Lorsqu'on stimule la croissance des cellules par le PDGF on note l'apparition de la synthèse des protéines habituellement induites par l'interféron (7). Le TNF (Tumor necrosis factor) qui peut stimuler la croissance des fibroblastes humains (8), induit la synthèse de l'IFN β . L'IFN bêta est également détecté comme un facteur autocrine de rétroinhibition au cours de la différenciation de cellules hématopoïétiques ou du tissu épithélial cutané en voie de caractérisation (9).

En résumé, ce système joue un rôle apparemment important pour entraver la croissance excessive des tissus en voie de différenciation ou déjà différenciés.

EFFET DES INTERFERONS SUR L'EXPRESSION DES PROTO-ONCOGENES

Après stimulation par un facteur de croissance, certains gènes cellulaires normaux sont régulièrement exprimés en phase G0-G1. Par exemple au cours de la prolifération lymphocytaire induite par les antigènes ou par les lectines, le gène *c-fos* est transcrit pendant la première heure et le gène *c-myc*, 3 h plus tard. Le traitement des cellules par l'IFN, après le stimulus initial, inhibe la transcription de ses gènes (10). On peut donc conclure que l'interféron peut régler directement l'expression de gènes de croissance ou agir indirectement par l'intermédiaire des facteurs de croissance.

SARCOLECTINE, ACTION ANTAGONISTE DES EFFETS BIOLOGIQUES DES INTERFERONS

Dans le placenta et dans une très grande variété de tissus normaux ou tumoraux, on détecte des substances capables de dégrader l'effet antiviral de l'IFN une fois établi. Un groupe de ces antagonistes a été isolé et caractérisé ; ils ont été appelés «sarcolectines» car ils sont retrouvés en quantité

relativement élevée dans les sarcomes, le muscle, le cartilage costal, le cerveau et le placenta. Les sarcolectines ont un poids moléculaire de 65 Kd.

Elles sont sensibles aux protéases mais résistent à la pepsine : elles agglutinent des cellules normales ou transformées et ont une affinité pour les sucres simples. L'analyse de la structure antigénique des sarcolectines d'origine diverse révèle qu'elles ont des épitopes communs. Il convient d'insister sur le fait que les sarcolectines n'ont pas d'action sur les récepteurs de l'IFN mais dégradent la synthèse des protéines secondaires induites dans la cellule par cette substance (11) (12).

Une image d'ensemble commence à surgir de ces observations résumées dans le présent article : les cellules stimulées par les facteurs de croissance induisent au cours de la division cellulaire la synthèse d'IFN par rétro-inhibition. A son tour, la sarcolectine inhibe l'effet biologique de l'IFN et restaure dans la cellule, l'état initial. Un tel mécanisme contribue à ralentir la croissance des tissus dont la régulation deviendrait plus efficace grâce à ces relais par petites étapes successives. «Les échanges métaboliques ont besoin de petites monnaies» (Szent Gyorgyi).

REVERSION DES CELLULES TRANSFORMEES A L'ETAT MALIN

Certains proto-oncogènes peuvent devenir oncogènes par suite de mutation, cassure chromosomique ou par transfert à d'autres régions du génome. Ces oncogènes peuvent stimuler d'une façon continue la multiplication cellulaire et deviennent inaccessibles aux mécanismes habituels de contrôle négatif. Dans certains cas cependant, les interférons peuvent quand même agir sur les oncogènes, ce qui peut aboutir à la réversion des cellules transformées de l'état malin à l'état non cancérogène.

En 1966, nous avons transformé des cellules embryonnaires de souris Balb C avec le virus du sarcome de Moloney. Ce rétrovirus existe dans la cellule infectée sous deux formes : un virus infectieux appelé «helper», et un virus identique mais défectif, car il est incorporé dans une fraction faible de la population cellulaire. Ces cellules malignes cultivées *in vitro* sont traitées par de faibles concentrations d'IFN pendant 2 ans (200 passages successifs). Elles ont alors récupéré des propriétés

morphologiques et structurales d'une cellule non maligne avec réapparition, bien qu'incomplète, du cytosquelette et de la matrice extracellulaire, disparue au cours de la transformation. Ces cellules normalisées ne sont plus capables d'induire des tumeurs même chez les souris «Nude», chez lesquelles les cellules malignes d'origine (traitées par le milieu de culture et maintenues en parallèle), produisent des tumeurs, 14-15 jours après l'inoculation (13, 14, 15, 16, 17). Le gène *v-mos* responsable de la transformation se retrouve au même endroit du génome avant et après le traitement, ce qui démontre que c'est réellement le fonctionnement de la cellule maligne qui a été modifié. Un point intéressant est que lorsqu'on élimine l'IFN du milieu de culture, les cellules restent non cancéreuses. Ces cellules révertantes sont capables d'exprimer d'une façon constitutive l'IFN dans toutes les cellules, contribuant vraisemblablement au maintien de l'état non malin (18). Le gène *v-mos* est parfaitement exprimé dans les cellules non malignes mais incapable de synthétiser la protéine *mos* indispensable pour induire et maintenir l'état transformé malin. D'autre part, les mRNA *mos* ne sont pas intégrés dans les virions et on constate que la cellule ne synthétise plus que le virus «helper». Cette action apparemment sélective de l'IFN sur le gène *mos* est une notion intéressante et pas encore éclaircie qui demande d'autres investigations.

IMPORTANCE DU SYSTEME INTERFERON DANS LA LUTTE ANTIVIRALE ET ANTITUMORALE

La possibilité d'utiliser efficacement l'IFN dépend de la compréhension par l'expérimentateur du fonctionnement de ce système. Sur le plan antitumoral, il faut garder à l'esprit que la plupart des cellules transformées subissent des altérations biochimiques parmi lesquelles il convient d'insister sur la dégradation des constituants du cytosquelette et de la matrice-extracellulaire. Pour cette raison les cellules malignes sont 10 à 100 fois moins sensibles à l'action antivirale de l'IFN que les cellules normales dont elles dérivent (1). Cet état de fait contraint le clinicien à employer des doses considérables pour des résultats le plus souvent modestes. Par ailleurs à l'insensibilité des cellules malignes à l'IFN, s'ajoute l'inhibition des fonctions immunitaires par cette substance employée à haute dose. Lorsque le processus de transformation survient à un stade relativement tardif de la

différenciation (comme c'est le cas vraisemblablement au cours des tricho-leucémies), la cellule reste sensible à de faibles concentrations d'IFN, qui est alors capable de reconvertir les cellules pathologiques (lymphocytes B) à un état différencié, s'intégrant par la suite dans la population normale à durée de vie limitée.

APPLICATIONS THERAPEUTIQUES POSSIBLES

Comme le système IFN semble exercer un contrôle de rétro-inhibition à un stimulus prolifératif, un traitement de type biologique non destructeur devrait conserver au moins partiellement l'équilibre entre les facteurs de croissance et la réponse anti-proliférative.

Expérimentalement, lorsqu'une tumeur est greffée à un animal, les meilleurs effets antitumoraux sont obtenus après injection unique d'un stimulant immunitaire à large spectre, suivi par un traitement à l'interféron pendant une vingtaine de jours. Le cycle d'administration d'immuno-stimulant-IFN peut être recommencé régulièrement une fois par mois environ (19). Dans le cas des souris AKR, lignée consanguine, qui synthétisent un rétrovirus rappelant l'HTLV1 et meurent au cours d'une leucémie lymphoïde à cellules T, le traitement utilisant uniquement l'immunostimulation ou de l'IFN seul est inefficace. L'utilisation de doses élevées d'IFN, administrées isolément, aboutit d'ailleurs au déficit immunitaire aigu désigné habituellement chez les souris AKR par le nom de

«vasting syndrome». Par contre, le traitement immunostimulant + IFN prolonge la survie de ces souris d'une façon significative (20). Ces notions peuvent probablement s'appliquer au virus SIDA, relativement proche structuralement de ces rétrovirus qui détruisent les cellules T (helper). On peut émettre l'hypothèse que les difficultés de traitement sont liées à l'asynchronie possible entre la multiplication virale et les traitements antiviraux. En effet, dans la cellule en interphase, le génome viral semble être intégré dans le DNA et ne peut être activé qu'en stimulant la prolifération de la cellule hôte. Le virus une fois activé dissémine au hasard et se fixe sur les cellules possédant des sites récepteurs. La diffusion de l'infection va être rapidement arrêtée par la production d'IFN (probablement par les macrophages), souvent détectée au cours des poussées chez les malades. Dans l'intervalle des cycles d'infection successifs, le nombre de cellules cibles infectées s'accroît. Cette diffusion par petites étapes pourrait expliquer au moins en partie, la durée prolongée du processus pathologique, et en même temps, l'inefficacité des traitements en dehors des phases végétatives de la multiplication. A l'instar des souris AKR précédemment citées, l'association d'une immunostimulation (unique) et d'un traitement IFN approprié pourrait agir opportunément, en inhibant la multiplication juste à une des phases de la synthèse des virions.

A la lumière des progrès récents, brièvement résumés ici, on peut donc conclure que le système IFN joue un rôle régulateur important dans le développement de la croissance tissulaire normale et que la connaissance de ce mécanisme peut devenir utile dans la lutte antivirale et antitumorale.

SUMMARY INTERFERONS, GROWTH FACTORS AND SARCOLECTINS AS REGULATORS OF COORDINATED GROWTH. REVERSION OF CANCER CELLS TO NON-MALIGNANCY

The interferon system is heterogeneous, consisting of a great variety of alpha, one beta and one gamma interferons. This could reflect the complexity of its biological role. We suggest that the main biological function of interferons could be the regulation of coordinated cell growth. This is based on the following observations : firstly, interferons and growth factors, as well as antagonists of the interferon functions called sarcolectins, are constantly present in the placenta during the fetal phase of pregnancy. These interferons could act as a negative feedback regulators for growth factors, which in turn are inhibited by sarcolectins. In parallel, interferons regulate the expression of proto-oncogenes. Secondly, we have demonstrated that, at least in some cases, prolonged interferon treatment of malignant mouse cells can also affect the expression of oncogenes (such as v-mos), which results in a stable reversion to non-malignancy, even when interferon is removed from the medium. The cells completely lose their capacity to produce tumors in nude mice. The model presented here could also be of interest for developing anti-tumoral protocols in patients. This is suggested by the sensitivity of hairy cell leukemias to prolonged interferon treatment.

Key-words : Interferons – Growth factors – Sarcolectins.

BIBLIOGRAPHIE

1. CHANY C. — Interferon receptors and interferon binding. In «*Interferon*», volume 3, 1984, Elsevier Science.
2. LEBON P., GIRARD S., THEPOT F., CHANY C. — Presence of alpha-interferon in human amniotic fluid. *J. Gen. Virol.*, 1982, 59, 393-396.
3. DUC-GOIRAN P., ROBERT-GALLIOT B., LOPEZ J., CHANY C. — Unusual apparently constitutive interferons and antagonists in human placental blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1985, 82, 5010-5014.
4. FOWLER A.H., REED C.D., GIRON D.J. — Identification of interferon in murine placentas. *Nature (London)*, 1980, 286, 266.
5. INGLOT A.D., CLESZAK E., KISTELOW — Antagonism in action between mouse or human interferon and platelet growth factor. *Arch. Virol.*, 1980, 63, 291.
6. ZON K., NEDDEN D.Z., HU R., KARASAKI Y., KOMORIYA A. and ARNHEITER H. — In «*Interferon system*», Sero Symposium Dianzani, F. Rossi, G.B. Raven Press, 1985, 24, 363-365.
7. ZULLO J.N., COCHRAN B.H., HUANG A.S., STILES C.D. — Platelet derived growth factor and double-stranded ribonucleic acids stimulate expression of the same genes in 3T3 cells. *Cell.*, 1985, 43, 793-800.
8. VILCEK J., TSUJIMOTO M., HENRIKSEN DE STEPHANO, D., HIRAI M., KOHASE M. — Growth factors as IFN inducers and IFN inducers as growth factors. *J. of Cellular Biochemistry Suppl.*, 1986, 10C, 216.
9. RESNITZKY D., YARDEN A., ZIPORI D., KIMCHI A. — Autocrine β -related interferon controls c-myc suppression and growth arrest during hematopoietic cell differentiation. *Cell*, 1986, 46, 31-40.
10. JONAK G.J., KNIGHT F. — Selective reduction of c-myc mRNA in Daudi cells by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1984, 81, 1747-1750.
11. CHANY-FOURNIER F., PAULOIN A., CHANY C. — Isolation preliminary characterization and interferon antagonistic effect of a mammalian lectin-like substance. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1978, 75, 2333-2337.
12. JIANG P.H., CHANY-FOURNIER F., ROBERT-GALLIOT B., SARRAGNE M., CHANY C. — Sarcolectin : An interferon antagonist extracted from hamster sarcomas and normal muscles. Isolation, Characterization and Purification. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 12361-12367.
13. CHANY C., VIGNAL M. — Effect of prolonged interferon treatment on mouse embryonic fibroblast transformed by murine sarcoma virus. *J. Gen. Virol.*, 1970, 7, 203-210.
14. GERFAUX J., ROUSSET S., CHANY-FOURNIER F., CHANY C. — Interferon effect on collagen and fibronectin distribution in the extracellular matrix of murine sarcoma virus-transformed cells. *Cancer Res.*, 1981, 41, 3629-3634.
15. BOURGEADE M.F., ROUSSET S., PAULIN D., CHANY C. Reorganization of the cytoskeleton by interferon in MSV-transformed cells. *J. Interferon Res.*, 1981, 1, 323-332.
16. CHANY C., GERFAUX J., SERGIESCU D. — Persistent expression of the v.mos gene in reconverted non tumorigenic cells after long term IFN treatment. *The Biology of the Interferon system*, 1985, 317-325.
17. SERGIESCU D., GERFAUX J., JORET A.M., CHANY C. — Persistent expression of v-mos oncogene in transformed cells that revert to nonmalignancy after prolonged treatment with interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1986, 83, in press.
18. GERFAUX J., SERGIESCU D., VIGNAL M., JORET A.M., CHANY C. — Stable reversion to non malignancy by long term interferon treatment of cells expressing the v-mos oncogene. *UCLA Symposia on Molecular & Cellular Biology*, Abstract M.50, 236 Suppl. 10C, 1986.
19. CHANY C., CERUTTI I. — Antitumoral effect of arginine butyrate in conjunction with Coryne Parvum and interferon. *Int. J. Cancer*, 1982, 30, 489-493.
20. CHANY C., CERUTTI I., MACE B. — Effect of coordinated therapeutic assay using C. Parvum and arginine butyrate on the spontaneous disease and survival of AKR mice. *Int. J. Cancer*, 1983, 32, 379-383.

☆ ☆ ☆