

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

---

**Les copolymères à blocs pour le transfert de gènes  
dans le muscle squelettique.**

---

**THESE DE DOCTORAT**

**Ecole doctorale CHIMIE-BIOLOGIE de NANTES**  
**Discipline** : Sciences de la vie et de la santé  
**Spécialité** : Biologie cellulaire et moléculaire

*présentée  
et soutenue publiquement par*

**Peggy RICHARD-FIARDO**

le 24 Octobre 2006, devant le jury ci-dessous

**Rapporteurs**            **Dr. Marie-Pierre ROLS**, *Directrice de Recherche CNRS, Toulouse*  
                                 **Ph. Yves BEUZARD**, *Professeur à l'Université de Paris VII*

**Examineurs**            **Ph. Patricia LEMARCHAND**, *Professeur à l'Université de Nantes*  
                                 **Dr. Luis GARCIA**, *Chargé de Recherche CNRS, Evry*  
                                 **Dr. Rémi HOULGATTE**, *Directeur de Recherche INSERM, Nantes*

**Directeur de Thèse**    **Dr. Bruno PITARD**, *Chargé de Recherche CNRS, Nantes*

# Table des matières

<b>Liste des Abréviations</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des illustrations</b> .....	<b>6</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>8</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>10</b>
1. Introduction au transfert de gènes .....	10
2. Transfert de gènes dans le muscle squelettique.....	11
2.1. Physiologie du muscle squelettique.....	11
2.2. Les outils pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique.....	16
a. Les vecteurs viraux.....	16
b. Les vecteurs non viraux.....	17
3. Transfert de gènes dans le muscle squelettique à l'aide de polymères. ....	27
3.1. Les PINCs.....	28
3.2. Les copolymères à blocs.....	28
a. Définition.....	28
b. Applications et activités biologiques.....	30
c. Copolymères à blocs et transfert de gènes.....	32
d. Mécanisme(s) d'action pour le transfert de gènes.....	34
4. Stabilité de l'expression génique après transfert de gènes non viral.....	36
4.1. Les motifs CpG non méthylés.....	36
4.2. Promoteurs dirigeants l'expression du transgène.....	36
4.3. Intégration chromosomique.....	37
5. Applications du transfert de gènes non viral dans le muscle squelettique. ....	38
5.1. Expression de protéines intracellulaires pour le traitement de maladies musculaires ....	38
a. Dystrophie musculaire de Duchenne.....	38
b. Modèles animaux de la myopathie de Duchenne.....	41
c. Approches thérapeutiques et thérapie génique de la myopathie de Duchenne.....	43
5.2. Sécrétion ectopique de protéines après transfert de gènes dans le muscle squelettique..	50
a. Sécrétion locale de protéines.....	51
b. Sécrétion systémique de protéines.....	52
6. Les systèmes de régulation pour le transfert de gènes codant des protéines sécrétées. ....	60
6.1. Régulation par un contrôle de l'initiation de la transcription.....	61
a. Systèmes existants basés sur des éléments exogènes.....	62
b. Systèmes existants basés sur des éléments endogènes.....	70
6.2. Régulation au niveau post-transcriptionnel.....	74
a. Régulation de la stabilité de l'ARN.....	74
b. Régulation par modifications traductionnelles de la protéine.....	75
<b>Matériels et Méthodes</b> .....	<b>76</b>
1. Matériels.....	76
1.1. Plasmides.....	76
1.2. "small interfering" ARN (siRNA) anti-EPO.....	78
1.3. Lignée cellulaire.....	78
1.4. Animaux.....	78
1.5. Préparation des formulations.....	78
2. Méthodes.....	79
2.1. Animaux et traitements.....	79
2.2. Analyse de l'expression des gènes.....	80
2.3. Extraction ARNtotal et RT-PCR (reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction)....	84

2.4.	Dosage de l'Interleukine 6 (IL-6) .....	84
2.5.	Analyses histochimiques .....	85
2.6.	Détermination du pourcentage de réticulocytes circulants .....	85
2.7.	Détection des anticorps dirigés contre l'EPO .....	85
2.8.	Dosage plasmatique de l'urée et de la créatinine.....	86
2.9.	Western blot.....	86
2.10.	Tests statistiques .....	86
<b>Résultats .....</b>		<b>87</b>
<b>Chapitre 1</b>		
<i>Transfert du gène codant la mini-dystrophine à l'aide de copolymères à blocs chez la souris mdx</i>		88
-	Evaluation de l'efficacité du transfert de gène dans le muscle dystrophique .....	89
-	Transfert de gène dans le muscle squelettique sain en régénérescence. ....	91
-	Transfert du gène codant la mini-dystrophinechez la souris mdx .....	92
-	Restauration des protéines du complexe DGC à la membrane des fibres après transfert de gène. ....	94
<b>Chapitre 2</b>		
<i>Sécrétion ectopique de protéines à partir du muscle squelettique après transfert de gène.....</i>		<i>96</i>
Transfert de gènes codant des protéines sécrétées à l'aide de copolymères à blocs dans le muscle squelettique. ....		97
Traitement de l'anémie acquise au cours de l'insuffisance rénale chronique chez la souris. ....		99
-	Sécrétion d'érythropoïétine après transfert de gène dans le muscle squelettique.....	99
-	Anémie autoimmune après transfert du gène codant l'EPOm chez la souris Swiss immunocompétente.....	103
-	Absence d'anémie autoimmune après transfert de gène chez la souris Swiss.....	109
-	Correction du phénotype anémique après transfert de gène codant l'EPOm dans un modèle de souris en IRC.....	111
<b>Chapitre 3</b>		
<i>Régulation de la sécrétion de protéines à partir du muscle squelettique après transfert de gène .</i>		<i>118</i>
-	Sécrétion inductible d'érythropoïétine après transfert de gène dans le muscle squelettique.....	120
-	Régulation de l'expression du transgène par la doxycycline après transfert de gène dans le muscle squelettique .....	123
-	Réaction immunitaire contre le transactivateur rtTA2s-M2 .....	124
<b>Discussion et perspectives .....</b>		<b>127</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>141</b>
<b>Publications :</b>		
-	Article 1	
-	Article 2	
-	Article 3	
-	Autres articles	

# Liste des Abréviations

Pour des raisons de lisibilité, la signification d'une abréviation n'est souvent rappelée qu'à sa première apparition dans le texte d'un chapitre. Par ailleurs, puisque nous utilisons toujours l'abréviation la plus usuelle, il est fréquent que ce soit le terme anglais qui soit employé, auquel cas nous l'indiquons en italique ou nous présentons une traduction quand cela est nécessaire.

**$\alpha$ -1AT** : alpha-1-antitrypsine

**$\alpha$ -SARC** : *alpha-sarcoglycan*

**AAV** : virus associé à l'adénovirus

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADP** : Adénosine di-phosphate

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**ATP** : Adénosine tri-phosphate

**$\beta$ -DG** : *beta-dystroglycan*

**BMD** : *Becker muscular dystrophy*

**bp** : paire de bases

**BSA** : albumine bovine sérique

**CAG** : promoteur chimère de la  $\beta$ -actine de poulet fusionné à l'enhancer du promoteur précoce de cytomégalovirus

**DGC** : *Dystrophin-associated Glycoprotein Complex*

**CEC** : couplage excitation contraction

**CMC** : concentration micellaire critique

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**CMT** : température micellaire critique

**CMV** : cytomégalovirus

**CPA** : cellule présentatrice d'antigènes

**Cps** : coups par seconde

**DMD** : Dystrophie musculaire de Duchenne

**DMEM** : *Dubelcco's Mod Eagle Medium*

**Dnase** : désoxyribonucléase

**DO** : densité optique

**Dox** : doxycycline

**EBV** : *Epstein Barr virus*

**ELISA** : *enzyme linked immunosorbent assay*

**EPO** : érythropoïétine  
**FVIII** : facteur VIII de coagulation  
**FIX** : facteur IX de coagulation  
**GFP** : *green fluorescent protein*  
**GHRH** : *growth hormone*  
**GHRH** : *growth hormone releasing hormone*  
**GRMD** : *Golden Retriever Muscular Dystrophy*  
**Hct** : hématocrite  
**HRE**: *hypoxia response elements*  
**HIF** : *hypoxia inducible factor*  
**HSV** : Herpès Simplex Virus  
**IGF-1** : *insulin like growth factor 1*  
**IM** : intramusculaire  
**IRC** : insuffisance rénale chronique  
**IV** : intraveineuse  
**Kda** : kiloDalton  
**Luc** : luciférase  
**Mdx** (souris) : *X linked Muscular Dystrophy*  
**OE** : oxyde d'éthylène  
**OP** : oxyde de propylène  
**PBS** : *phosphate buffer saline*  
**PCR** : *polymerase chain reaction*  
**PEI** : polyéthylène imine  
**PVA** : polyvinyl alcohol  
**PVP** : polyvinylpyrrolidone  
**RSV** : virus Rous Sarcoma  
**RT-PCR** : *reverse transcriptase polymerase chain reaction*  
**SeAP** : phosphatase alcaline sécrétée  
**rtTA** : *reverse Tetracycline-controlled TransActivator*  
**RNase** : ribonucléase  
**siRNA** : *small interfering ribonucleotide acid*  
**SV-40** : Simian virus  
**Tet** : tétracycline  
**TetO** : opérateur à la tétracycline  
**TetR** : répresseur à la tétracycline  
**WPRES** : *wood hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*

## Liste des illustrations

Figure 1-Les cibles thérapeutiques du transfert de gènes.....	10
Figure 2-Anatomie du muscle strié squelettique à l'échelle macroscopique.....	11
Figure 3-Anatomie du muscle squelettique à l'échelle microscopique.....	12
Figure 4-Représentation schématique des différentes étapes de la différenciation musculaire.....	14
Figure 5-Réalisation pratique de l'électrotransfert.....	22
Figure 6-Inhibition dose-dépendance des lipides cationiques pour le transfert de gènes in vivo (données personnelles).....	27
Tableau 1-Caractéristiques physico-chimiques de certains poloxamères à 37°C.....	29
Figure 7-Structure des copolymères à blocs selon la concentration micellaire critique CMC et la température micellaire critique CMT.....	30
Tableau 2- Applications pharmaceutiques et biomédicales de certains copolymères à blocs.....	31
Figure 8-Transfert de gènes dans le muscle squelettique à l'aide de copolymères à blocs.....	33
Figure 9-Organisation du complexe protéique associé à la dystrophine dans une cellule musculaire striée.....	40
Figure 10-Représentation schématique de la structure de la dystrophine et des protéines associées..	40
Figure 11-Représentation schématique de la technique du saut d'exon.....	47
Figure 12-Principe théorique de la sécrétion ectopique de protéines : avantage pharmacocinétique de la thérapie génique.....	51
Figure 13-Schéma simplifié de l'érythropoïèse.....	55
Figure 14 -Schéma général de la synthèse d'une protéine avec les différentes étapes de transcription et de traduction ainsi que les trois stratégies de régulation décrites dans la littérature.....	61
Figure 15-Schéma du système suppressible par la tétracycline Tet-Off.....	63
Figure 16-Schéma du système inductible par la tétracycline Tet-On + tTS.....	65
Figure 17-Schéma du système inductible par l'ecdysone.....	67
Figure 18-Schéma du système inductible par la mifeprestone/RU486.....	68
Figure 19-Schéma du système inductible par la rapamycine.....	69
Figure 20-Schéma du système inductible par les thiazolidinediones.....	73
Figure 21-Schéma de la méthode SELEX.....	74
Figure 22-Schéma du système de régulation de la sécrétion de protéines contrôlée par l'agrégation dans le réticulum endoplasmique.....	75
Figure 23-Transfert du gène codant la luciférase in vivo à l'aide de copolymères à blocs.....	89
Figure 24-Coupes transversales de tibiaux antérieurs de souris C57bl/10 saines et mdx.....	90
Figure 25-Activité luciférase relative dans le tibia antérieur de souris en régénérescence.....	92
Figure 26-Immunomarquage de la dystrophine sur coupes transversales après transfert du gène non viral de la mini-dystrophine.....	93
Figure 27-Détection des fibres exprimant la dystrophine et ses protéines associées du complexe DGC. .....	95
Figure 28-Dosage de l'activité phosphatase alcaline murine dans le plasma des souris injectées avec différents copolymères à blocs.....	97
Figure 29-Dosage de l'activité phosphatase alcaline dans le plasma des souris à différents temps après le transfert de gènes.....	98
Figure 30-Mesure de l'hématocrite des souris après transfert de gène dans le muscle squelettique..	99
Figure 31-Suivi du taux d'hématocrite des souris après transfert de gène dans le muscle squelettique. .....	101
Figure 32-Détection du transcrit et de la protéine EPO 50 jours après transfert de gène dans le muscle squelettique de souris.....	102
Figure 33-Suivi du taux d'hématocrite après transfert de gène dans le muscle squelettique de souris Swiss et C57bl/6.....	103
Figure 34-Réponse inflammatoire et analyse histopathologique de muscle de souris Swiss après transfert de gène.....	104

<i>Figure 35-Suivi du taux d'hématocrite après transfert de gène dans le muscle squelettique de souris immunosupprimées.</i>	105
<i>Figure 36-Suivi du taux d'hématocrite après transfert de gène dans le muscle squelettique de souris Swiss.</i>	106
<i>Figure 37-Inhibition de la fonctionnalité de l'EPO recombinante par le sérum de souris anémiques après transfert de gène.</i>	107
<i>Figure 38-Mesure du taux de réticulocytes après transfert de gène dans le muscle squelettique de souris.</i>	108
<i>Figure 39-Suivi du taux d'hématocrite après transfert de gène et de siRNA dans le muscle squelettique de souris Swiss.</i>	110
<i>Figure 40-Suivi du taux d'hématocrite après multi-injections du gène codant l'EPO murine dans le muscle squelettique de souris Swiss.</i>	111
<i>Figure 41- Caractérisation du modèle de souris en IRC.</i>	114
<i>Figure 42-Suivi du taux d'hématocrite après transfert du gène codant l'EPO murine dans le muscle squelettique de souris Swiss traitées à l'adénine 0,25%.</i>	115
<i>Tableau 5- Détermination de l'hématocrite et du pourcentage de réticulocytes chez les souris en IRC après transfert de gène dans le muscle squelettique.</i>	116
<i>Tableau 6- Détermination des concentrations de créatinine et d'urée plasmatiques chez les souris en IRC après transfert de gène dans le muscle squelettique.</i>	117
<i>Figure 43-Suivi du taux d'hématocrite après transfert du gène dans le muscle squelettique de souris traitées ou non à la doxycycline.</i>	121
<i>Figure 44-Suivi du taux d'hématocrite après transfert du gène dans le muscle squelettique de souris.</i>	122
<i>Figure 45-Régulation du taux d'hématocrite après transfert du gène dans le muscle squelettique de souris.</i>	123
<i>Figure 46-Régulation du taux d'hématocrite après transfert du gène dans le muscle squelettique de souris.</i>	124
<i>Figure 47-Régulation du taux d'hématocrite après transfert du gène dans le muscle squelettique de souris.</i>	125
<i>Figure 48-Réponse immunitaire humorale contre le transactivateur rtTA2s-M2 après transfert de gène chez la souris.</i>	126

# Avant-propos

---

Au début des années 1980 le développement du génie génétique a permis la maîtrise de nouveaux procédés techniques à l'échelle cellulaire et moléculaire, rendant possible l'exploration du génome humain. Parmi ces avancées, la thérapie génique apparaît comme une nouvelle étape fondamentale dans l'histoire de la médecine qui permet de contrer directement les causes de la maladie plutôt que de s'attaquer seulement aux symptômes. La thérapie génique relève encore seulement du domaine expérimental, on ne peut pour l'instant que parler de résultats en terme d'essais cliniques. Toutefois, en décembre 1999, après des années de recherche, est survenu le premier succès probant par l'équipe du professeur Alain Fischer chez des "enfants bulles", atteints du syndrome immunitaire combiné sévère (DICS) lié au chromosome X (*Cavazzana-Calvo et al., 2000, Cavazzana-Calvo et al., 2001, Fischer et al., 2002*). Cet essai réalisé en France, à l'hôpital Necker, consistait à prélever des cellules souches de la moelle des patients, d'y introduire un gène fonctionnel par transfert *ex vivo*, avant d'être réimplantées. Depuis une dizaine d'années, le champ d'action de la thérapie génique s'est largement élargi et plus de 900 essais cliniques ont été approuvés dans le monde (*Edelstein et al., 2004*). Parmi tous les organes ciblés pour le transfert de gènes *in vivo*, le muscle squelettique représente un excellent organe non seulement pour le traitement de maladies génétiques héréditaires mais aussi acquises.

En effet, le transfert de gènes dans le muscle squelettique offre un potentiel certain en terme de simplicité et de coût pour le traitement de pathologies génétiques musculaires. La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie génétique récessive caractérisée par l'absence de dystrophine dans la totalité des muscles de l'organisme. Le transfert du gène codant la dystrophine dans le muscle squelettique représente une thérapie prometteuse.

Parmi toutes les méthodes utilisées pour délivrer efficacement un gène dans les fibres musculaires, les systèmes de transfert de gènes non viraux constituent une classe de vecteurs alliant efficacité et sécurité pour de nombreuses applications cliniques. Notre équipe a récemment identifié une nouvelle classe de vecteurs synthétiques efficace pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique, les copolymères à blocs (*Pitard et al., 2002, Pitard et al., 2004*). Le premier travail réalisé au cours de ma thèse s'attache donc à évaluer l'efficacité de ces nouveaux vecteurs pour permettre l'expression de la dystrophine dans le muscle pathologique de souris myopathes.

Dans un premier temps les maladies génétiques monogéniques sont apparues comme la cible idéale étant donné qu'un seul gène était impliqué et identifié. Mais rapidement les essais de thérapie génique ont été centrés sur les maladies acquises (*Ross et al., 1996*). Cette approche de transfert de gènes non virale dans le muscle squelettique est effectivement particulièrement appropriée pour la délivrance sur le long terme de protéines thérapeutiques dans la circulation générale. Elle représente un avantage considérable par rapport à l'administration de protéines recombinantes nécessitant des injections



répétées. Les intérêts cliniques se regroupent autour d'un champ d'application très vaste incluant les hémophilies, l'anémie chronique, les déficiences en hormone de croissance ou encore le diabète. Dans cette optique, la deuxième partie de ma thèse consiste à étudier le potentiel des copolymères à blocs pour la délivrance de gènes codant des protéines d'intérêt thérapeutique sécrétées dans la circulation après injection intramusculaire. Nous avons évalué le bénéfice du transfert de gène codant l'érythropoïétine dans le muscle squelettique à l'aide de copolymères à blocs, dans le but de suppléer les fonctions rénales altérées pour le traitement de l'anémie dans un modèle de murin d'insuffisance rénale chronique.

Cependant, l'expression à des niveaux inadéquats du transgène et une régulation incontrôlée de la protéine représentent des facteurs limitants pour un développement clinique efficace et sûr. C'est pourquoi un des enjeux majeurs de la thérapie génique est aujourd'hui de développer des systèmes de transfert de gènes facilement régulables à tout moment. Ce problème de régulation temporelle de l'expression d'un gène est particulièrement vrai dans le contexte du transfert de gène de l'érythropoïétine. Le risque déjà élevé d'hypertension artérielle et de thrombose chez les patients en insuffisance rénale ne doit pas être amplifié par l'administration de la protéine thérapeutique. Depuis quelques années une multitude de systèmes de régulation a été décrite dans la littérature, le système tétracycline inductible est de loin le plus utilisé pour le transfert de gènes. Dans la dernière partie de ce manuscrit, je me suis donc attachée à étudier le transfert du gène codant l'érythropoïétine dans le muscle squelettique de souris à l'aide d'un système de régulation de l'expression génique inductible par la tétracycline.

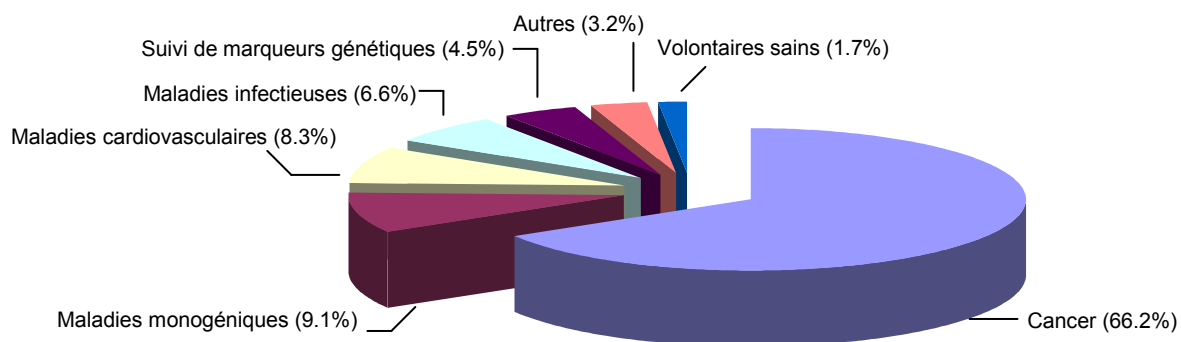
# Introduction

---

## 1. Introduction au transfert de gènes

Le transfert de gènes consiste à introduire un matériel génétique, sous forme d'ADN ou d'ARN, dans une cellule cible pour conduire à un effet physiologique souhaité. En pratique, le transfert de gènes consiste soit à compenser le dysfonctionnement d'un gène altéré ou absent, soit à apporter une nouvelle fonction à la cellule dans un but thérapeutique ou préventif. Le concept initial associé à la notion de transfert de gènes était celui de la thérapie génique au sens strict du terme, qui consiste à compenser un ou plusieurs gènes dont l'altération est responsable de maladies. Puis cette notion a été étendue à l'utilisation du gène comme nouveau type de médicament. Dès lors, le gène a été employé pour des indications débordant largement le cas des maladies génétiques puisqu'un gène médicament peut, à priori, remplacer n'importe quel médicament protéique dont il commandera la synthèse.

Le transfert de gène apparaît aujourd'hui comme une stratégie prometteuse, non seulement pour le traitement de maladies monogéniques telles que la mucoviscidose ou la dystrophie musculaire de Duchenne, mais aussi pour le traitement de maladies plus complexes ayant ou non des composantes génétiques telles que le diabète, ou les maladies cardiovasculaires, mais également pour le traitement de pathologies acquises comme les maladies infectieuses, le cancer, les pathologies de déficit (voir plus loin) (Figure 1). Une dernière application concerne plus particulièrement la vaccination.



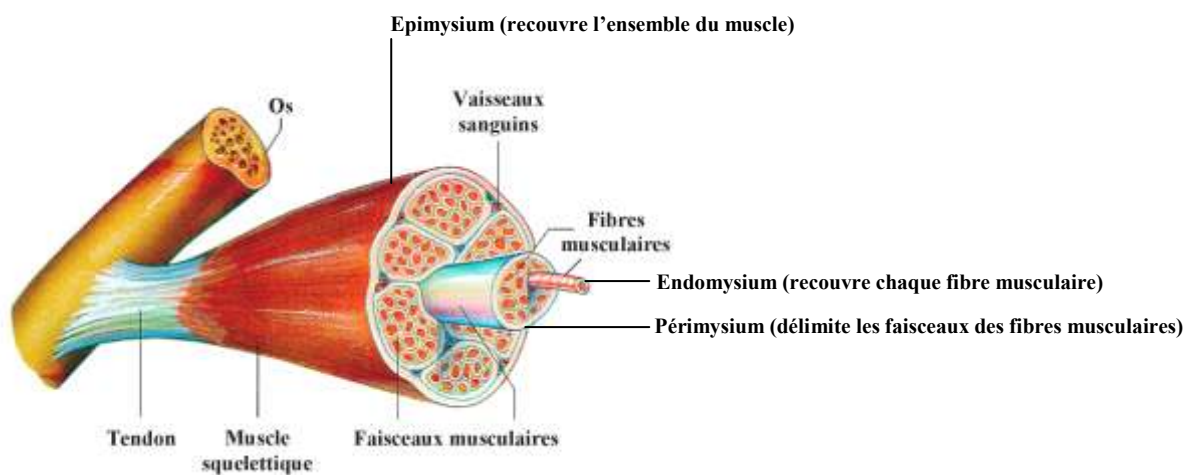
**Figure 1- Les cibles thérapeutiques du transfert de gènes.**  
D'après <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/> 2006

## 2. Transfert de gènes dans le muscle squelettique

Potentiellement, le transfert de gènes viral ou non viral dans le muscle squelettique apparaît comme une technique simple et efficace pour différentes applications cliniques dont (i) le traitement local de maladies génétiques neuromusculaires, (ii) l'expression et la sécrétion de protéines thérapeutiques sécrétées localement ou dans la circulation générale et (iii) l'expression d'antigènes pour des protocoles de vaccination prophylactique ou thérapeutique (*Prud'homme 2005*). Au cours de ce travail, nous nous intéresserons uniquement aux deux premières utilisations.

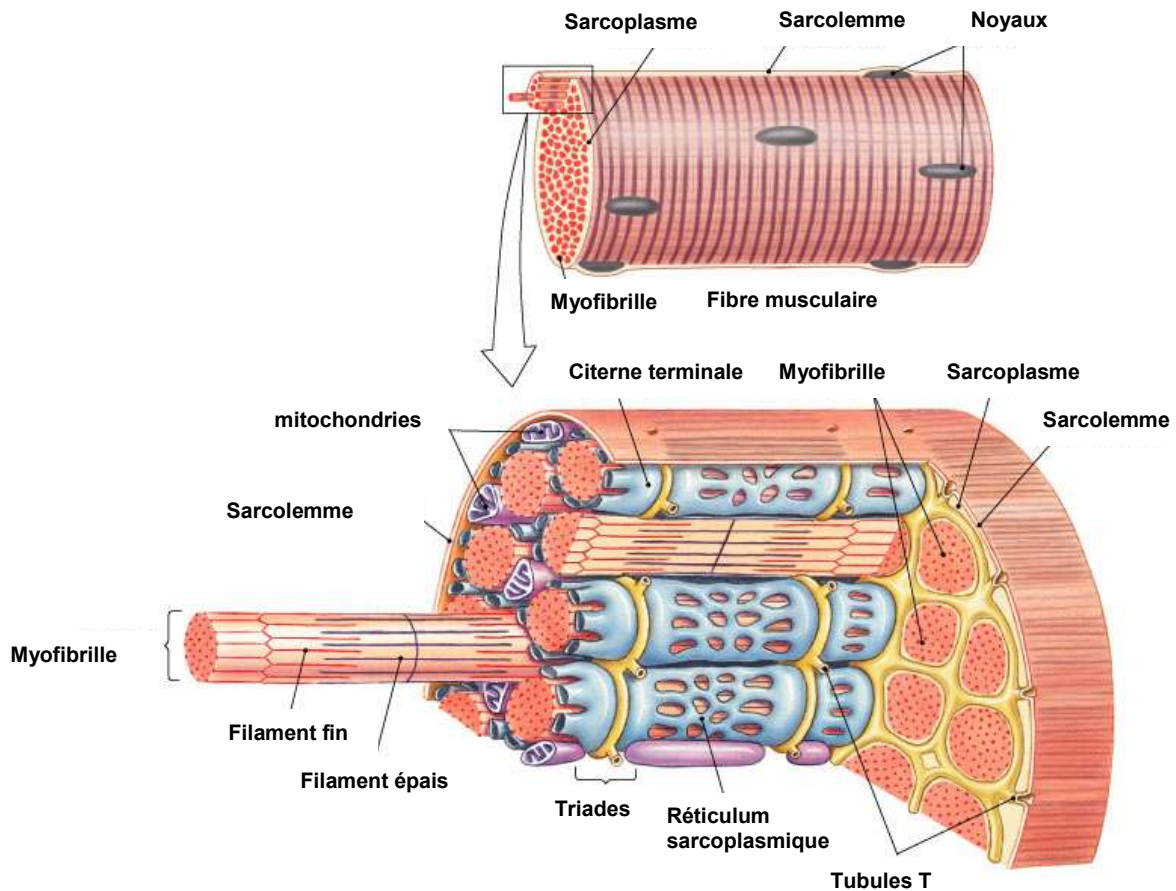
### 2.1. Physiologie du muscle squelettique

Le muscle squelettique est un muscle parcouru par des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses, constitué de faisceaux musculaires formés eux-même d'un ensemble de fibres musculaires (Figure 2). Chaque muscle est inséré sur l'os par l'intermédiaire de tendons constitués essentiellement de tissu fibreux, élastique et solide. Une loge musculaire comprend un groupe de muscles enveloppés d'un tissu d'emballage : l'aponévrose. Les aponévroses sont inextensibles, elles soutiennent les cellules musculaires et leur imposent de se contracter selon un certain axe. En effet, le muscle entier est entouré d'un tissu conjonctif dense appelé épimysium. Un fin tissu conjonctif, appelé périmysium, délimite les faisceaux des fibres musculaires. Et chaque fibre est elle-même enveloppée par un tissu appelé endomysium, essentiellement formé par la matrice extracellulaire et en continu avec la lame basale de la cellule. La lame basale présente des pores composés en majorité de protéoglycanes chargés négativement et dont la taille avoisine 40 nm.



**Figure 2-Anatomie du muscle strié squelettique à l'échelle macroscopique.**  
(source Association Française contre les Myopathies).

La fibre musculaire est une cellule différenciée, multinucléée, géante dont le diamètre varie de 10 à 100  $\mu\text{m}$  et dont la longueur dépasse parfois le décimètre. Cette cellule est entourée d'une membrane plasmique électriquement excitable (*le sarcolemme*) qui délimite le cytoplasme (*le sarcoplasme*) (Figure 3).



**Figure 3-Anatomie du muscle squelettique à l'échelle microscopique.**

Les fibres musculaires contiennent des myofibrilles (1 $\mu\text{m}$  de diamètre) parallèles qui parcourent toute la longueur de la cellule. Selon sa taille, chaque cellule peut posséder des centaines ou des milliers de myofibrilles, qui constituent environ 80 % de son volume. Le sarcolemme présente de fines invaginations tubulaires (tubules transverses ou tubules T) réparties régulièrement le long de la fibre musculaire et y pénétrant profondément. Les tubules T ont un diamètre de 30 nm environ, ce qui permet une communication de la cellule avec le milieu extracellulaire. Les myofibrilles baignent dans le sarcoplasme qui est constitué de glycogène, d'ATP, de phosphocréatine, d'enzymes glycolytiques, d'électrolytes inorganiques et de nombreux acides aminés et peptides.

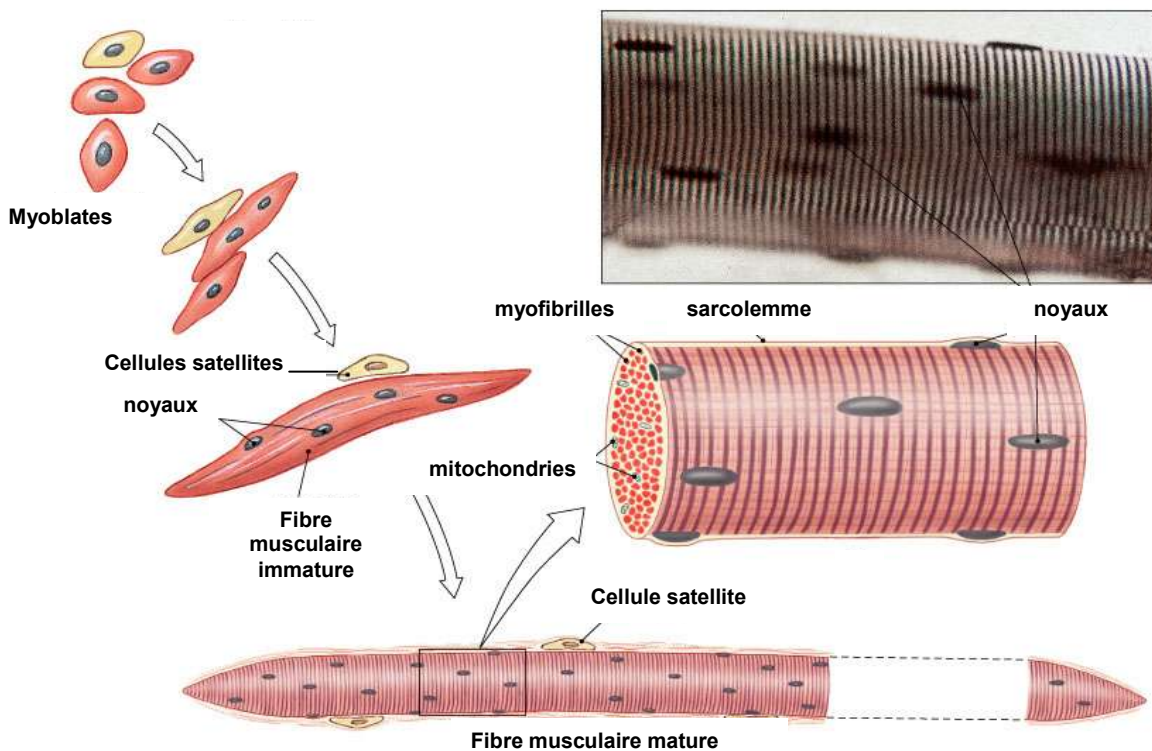
Les myofibrilles représentent les éléments contractiles des cellules des muscles et chaque myofibrille comprend elle-même une chaîne d'unités contractiles adjacentes encore plus petites nommées *sarcomères*. D'un point de vue fonctionnel, l'unité contractile qu'est le sarcomère contient deux sortes de filaments interagissant avec des protéines. Les filaments épais contiennent essentiellement la

myosine. Il s'agit d'un ATPase de 500 kDa environ, elle a pour rôle de convertir l'ATP en ADP. Les filaments fins contiennent quant à eux l'actine (42 kDa), la tropomyosine (70 kDa) et la troponine. Comme nous le verrons plus loin, les protéines spécifiques du muscle squelettique sont largement utilisées pour le développement de promoteurs muscle spécifique dans le contexte du transfert de gènes, c'est le cas par exemple de l' $\alpha$ -actine, la créatine kinase, la myosine et la troponine.

La fibre musculaire possède un réticulum sarcoplasmique (RS) lisse, chargé en calcium et particulièrement développé. Celui-ci forme des expansions de telle sorte que deux sacs de réticulum sarcoplasmique entourent chaque tubule T pour former une triade. La triade est la structure qui permet le passage du signal nerveux (sous forme de potentiel d'action) et la libération du calcium à partir du RS, c'est le couplage excitation-contraction (CEC). La fonction majeure du muscle est effectivement la contraction, il s'agit d'un mécanisme compliqué qui fait intervenir l'interaction des filaments d'actine et de myosine, la conversion de l'ATP en ADP et le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Brièvement, l'influx nerveux qui se propage le long du sarcolemme, atteint rapidement le système des tubules T, induit la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du RS. Ce  $\text{Ca}^{2+}$  se lie à la troponine avec une forte affinité, résultant en un changement conformationnel qui est détecté par la tropomyosine. Le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré induit également un changement structural de l'actine lui permettant alors d'interagir avec la myosine. Ces phénomènes résultent en la contraction du muscle et l'hydrolyse de l'ATP. L'arrêt de la stimulation électrique et le repompage du calcium par le RS et vers le milieu extracellulaire induisent l'arrêt de la contraction. Le muscle peut alors se relâcher.

Notons que les muscles squelettiques sont constitués de différents types de fibres en proportion variable selon leur fonction. Les fibres de type I à contraction lente ou fibres rouges sont très vascularisées et ont un diamètre relativement petit. Ces fibres contiennent de nombreuses mitochondries et peu de glycogène. On dit qu'elles ont un mécanisme oxydatif. Ces fibres sont très peu fatigables, elles sont surtout utilisées lors d'exercices peu puissants et prolongés (maintien de la posture). Les fibres de type II à contraction rapide ou fibres blanches sont de plus grand diamètre, pauvres en mitochondries, peu vascularisées, mais elles sont riches en glycogène. On parle alors de mécanisme glycolytique. Enfin les fibres de type IIa sont des fibres intermédiaires dont le pourcentage varie selon les muscles et l'individu. Le rapport fibres lentes/rapides peut évoluer en fonction de l'entraînement et du type d'exercice pratiqué.

Les myoblastes sont les précurseurs des cellules musculaires (Figure 4), ce sont des cellules fusiformes qui possèdent un noyau unique. Ces cellules sont capables de fusionner entre elles pour former les myotubes. A ce stade, les noyaux s'accolent et forme une chaîne centrale, les myofilaments sont périphériques. Suit une étape de différenciation au cours de laquelle les noyaux prennent alors une position périphérique alors que les myofilaments au contraire sont localisés au centre de la fibre musculaire.



**Figure 4- Représentation schématique des différentes étapes de la différenciation musculaire.**

Les myoblastes possèdent un noyau unique, ces cellules sont capables de fusionner entre elles, les noyaux s'accolent alors pour former une chaîne centrale, les myofilaments sont périphériques. Dans la fibre musculaire immature, les noyaux prennent une position périphérique alors que les myofilaments sont localisés au centre de la cellule. Entre la lame basale et le sarcolemme de la fibre, se localisent les cellules satellites.

Entre la lame basale et le sarcolemme de la fibre, sont localisées des cellules précurseurs souches quiescentes appelées cellules satellites. Ces cellules interviennent dans la croissance pré-et post-natale du muscle ainsi que dans sa régénération. Suite à une blessure, les cellules satellites sont activées en réponse à des stimuli externes, tels que des facteurs de croissance par exemple et sont capables de se multiplier et de fusionner avec une fibre endommagée pour donner naissance à une nouvelle fibre musculaire fonctionnelle. Dans ce cas, seule la partie endommagée de la fibre est régénérée, les noyaux des autres segments de la fibre restent viables.

Pendant l'enfance et la puberté, la croissance va entraîner une augmentation du volume du corps musculaire d'environ 20 fois. Le croissance du muscle après la naissance ne dépend pas d'une

augmentation du nombre de fibres musculaires (environ 250 millions chez l'homme), mais d'une augmentation de leur diamètre (liée à la synthèse de nouvelles myofibrilles) et de leur longueur. Ces modifications sont soumises à des facteurs nerveux, mécaniques et hormonaux.

En conclusion, le muscle squelettique est le tissu cible de référence pour le transfert de gènes d'une part pour le traitement de maladies génétiques héréditaires musculaires et d'autre part pour le traitement de maladies acquises nécessitant la sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique dans la circulation, et ceci car il offre de nombreux avantages résumés ici :

- il constitue un **large volume facilement accessible** (le muscle squelettique représente environ 40% de la masse corporelle),
- contrairement aux autres cellules de l'organisme, les cellules musculaires possèdent **plusieurs noyaux** ce qui permet une **bonne efficacité** du transfert de gènes,
- les fibres musculaires ont une **longue durée de vie**, car les cellules ne se divisent pas ce qui permet potentiellement une **expression du transgène sur le long terme** en l'absence de régénération musculaire importante. En cas de lésion localisée, seule la partie endommagée de la fibre est régénérée, les noyaux des autres segments de la fibre restent viables et continuent à exprimer le transgène (*Blaveri et al., 1999*).
- Outre les fibres musculaires et le tissu conjonctif qui le constituent, le muscle est parcouru par des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. Il possède ainsi une **vascularisation** sanguine importante permettant une délivrance du transgène par voie vasculaire. Cette caractéristique permet également d'utiliser le muscle squelettique comme **organe sécréteur** de protéines d'intérêt thérapeutique.

## 2.2. Les outils pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique

### a. Les vecteurs viraux

Parmi les différentes techniques de transfert de gènes dans les cellules cibles d'un organisme, une première technique consiste à transporter l'acide nucléique d'intérêt grâce à des vecteurs viraux, utilisant la capacité des virus à pénétrer dans les cellules hôtes pour y transférer leur génome.

De façon simplifiée, le principe du transfert de gène par des vecteurs viraux est le suivant : (1) les virus sont rendus inaptes à la réplication par délétion de la partie de leur génome essentielle à la réplication, (2) la cassette d'expression contenant un promoteur et le gène d'intérêt est insérée au niveau de cette délétion (la taille maximale de la cassette d'expression dépend du virus considéré), (3) ce virus recombinant est transfecté dans une lignée cellulaire d'encapsidation qui contient les gènes viraux indispensables, (4) les cellules d'encapsidation permettent ainsi la production de virus recombinants incapables de se répliquer ensuite dans les cellules cibles.

Une grande variété de virus sont utilisés pour le transfert de gènes, dont les adénovirus, l'herpès simplex virus (HSV), les lentivirus, et les virus associés aux adénovirus (AAV, pour adeno-associated virus). Les adénovirus et les AAVs sont les vecteurs viraux les plus utilisés à ce jour pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique, et ont déjà été utilisés en essais cliniques.

#### i. Les adénovirus

Les adénovirus (virus à ADNdb, capacité d'insert  $\leq 8$ kb) sont capables d'infecter de nombreux types de cellules quiescentes ou en division mais ont un tropisme naturel pour les voies aériennes supérieures. L'expression du transgène est transitoire ce qui peut être à la fois un avantage et un inconvénient. Leur principal défaut est leur forte immunogénicité due à l'expression résiduelle de protéines virales. Les adénovirus sont très efficaces pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique néonatal mais beaucoup moins dans le muscle mature à cause de la diminution du nombre de récepteurs spécifiques comme les récepteurs aux Coxsackie virus et adénovirus (récepteurs CAR) (Tomko *et al.*, 1997, Bergelson *et al.*, 1998, Cao *et al.*, 2001). Les alternatives consisteraient à injecter des titres viraux plus forts ou à fixer des ligands spécifiques sur les protéines de la capsid (Menezes *et al.*, 2006).

#### ii. Les «Adeno Associated Virus» (AAV)

Les vecteurs AAV (capacité d'insert  $\leq 5$ kb) tirent leur nom du fait qu'ils ont besoin de l'aide d'un autre virus (adénovirus ou HSV) pour accomplir leur cycle complet de réplication. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules cibles quiescentes ou en division. Le virus sauvage ne présente aucune toxicité pour l'homme mais une contamination potentielle par le virus helper est possible



pendant la préparation. Malgré les problèmes d'immunogénicité qu'ils entraînent, les vecteurs AAV semblent très prometteurs de part leur efficacité de transfection *in vivo*. En effet, les premiers essais *in vivo* ont montré une expression stable pendant plusieurs années chez la souris et plusieurs mois chez les gros animaux après injection intramusculaire. Parmi les différents sérotypes d'AAV, les sérotypes AAV2 et AAV6 semblent les plus propices au transfert de gènes dans le muscle squelettique (*Gao et al., 2004a*). L'administration de ces vecteurs viraux par voie intravasculaire semble également prometteuse pour la délivrance de gènes dans l'ensemble du muscle squelettique (*Greelish et al., 1999, Arruda et al., 2005, Su et al., 2005*). Les inconvénients majeurs des vecteurs AAV sont la relative difficulté de production en lots cliniques et en grande quantité et la difficulté de concevoir des injections répétées du fait de la mise en place d'une réponse immunitaire dirigée contre le vecteur (*Walker et al., 2005*).

## **b. Les vecteurs non viraux**

En parallèle de ces vecteurs viraux, des techniques de transfert de gène non virales ont largement été développées ces dernières années. Elles doivent conserver les avantages des vecteurs viraux (efficacité de transfection) tout en évitant leurs inconvénients (immunogénicité, insertion mutationnelle).

### **i. L'injection d'ADN nu**

Depuis les années 1990, l'équipe dirigée par Wolff, a reporté que les cellules musculaires, après injection intramusculaire d'ADN nu chez la souris, étaient capables de prendre en charge l'ADN et de permettre son expression de façon stable (au moins deux ans) (*Wolff et al., 1990, Hagstrom et al., 1996, Wolff et al., 1992*). Depuis, cette technique a été développée et améliorée chez d'autres espèces d'animaux et a permis le développement des premiers essais cliniques chez l'homme. Il s'agit d'une des seules techniques de transfert de gène non viral, avec les copolymères à blocs, utilisée en essai clinique dans le muscle squelettique (*Romero et al., 2002, Romero et al., 2004, Quezada et al., 2004*). Cette technique consiste à transférer l'ADN thérapeutique nu sous forme de plasmide. C'est la technique la plus directe de transfert de gènes, elle est utilisée pour transférer le foie après administration intraveineuse avec une pression hydrodynamique (*Budker et al., 2006*) et le muscle squelettique par injection intramusculaire (IM) ou intraveineuse (IV) locale (*Wolff et al., 1990, Budker et al., 1998, Hagstrom et al., 2004*).

On ne connaît encore pas à ce jour le mécanisme d'internalisation de l'ADN dans les cellules *in vivo*. Plusieurs facteurs pouvant influencer la prise en charge de l'ADN par les cellules musculaires ont été proposés.

(i) Une rupture de la membrane des fibres induite par l'injection IM pourrait être responsable de l'internalisation de l'ADN au sein de la cellule (*Wolff et al., 1992*). Il a été proposé que le plasmide

après injection diffusait passivement à travers les pores de la lame basale des myofibres (*Karpati et al., 1993*).

(ii) Après injection intramusculaire, la présence d'ADN plasmidique au niveau des tubules T et des cavéoles du sarcolemme suggère que ces structures jouent un rôle important dans la capture de l'ADN (*Wolff et al., 1992*). Ces observations suggèrent également qu'un mécanisme actif est impliqué pour l'internalisation de l'ADN dans les cellules musculaires.

(iii) Hagstrom et al., ont reporté que trois protéines du réticulum sarcoplasmique dont la triadine (une protéine impliquée dans la machinerie de couplage excitation-contraction), pouvaient lier l'ADN, médier son internalisation et son acheminement dans les cellules des muscles striés (*Hagstrom et al., 1996*). Ces protéines sont en effet capables de lier des fragments d'ADN double brin avec une forte affinité. La fixation de l'ADN à ces protéines du réticulum sarcoplasmique, associée à de fortes concentrations de cations divalents dans les triades, pourrait ainsi faciliter l'acheminement de l'ADN au sein des cellules musculaires *via* la formation de pores inter-membranaires. L'hypothèse selon laquelle l'ADN serait internalisé et véhiculé dans la cellule musculaire par un mécanisme de reconnaissance spécifique est appuyée par le fait qu'en excès d'ADN compétiteur de sperme de saumon, de dextran, ou d'héparine, la fixation d'ADN marqué au phosphore<sup>32</sup> à ces trois protéines est inhibée. Le phénomène d'internalisation de l'ADN serait un phénomène dose-dépendant, saturable et inhibé par compétition en présence de molécules polyanioniques (*Hagstrom et al., 1996, Levy et al., 1996*). D'autres travaux plus récents présument également l'existence de récepteurs spécifiques reconnaissant l'ADN et permettant son internalisation dans les fibres musculaires (*Budker et al., 2000, Satkauskas et al., 2001*).

Malgré les résultats encourageants de cette technique de transfert de gènes dans le muscle, les niveaux d'expression obtenus sont souvent trop faibles pour produire un effet thérapeutique (*Davis et al., 1993*). Seulement 1 à 2 % des fibres musculaires expriment le transgène et l'expression est limitée dans la zone de l'injection (*Levy et al., 1996*). De plus, l'ADN injecté présent dans l'espace extracellulaire est éliminé au bout de 90 minutes après injection intramusculaire (*Manthorpe et al., 1993, Barry et al., 1999*). L'ADN internalisé est également la cible de DNases intracellulaires, sa demi-vie dans le cytoplasme varie de 50 à 90 minutes post-injection et seulement 0.1% de l'ADN cytoplasmique entre dans le noyau (*Pollard et al., 2001*).

La distribution de l'ADN plasmidique peut être améliorée grâce à des injections préalables de larges volumes de solutions hypertoniques et par une technique d'injection imposant un positionnement longitudinal de l'aiguille le long de l'axe du muscle injecté (*Mumper et al., 1996*). Des études montrent que l'efficacité de transfection est améliorée de deux à quatre fois lorsque l'ADN est formulé dans un milieu contenant 150 mM de sodium phosphate (NaP) (*Hartikka et al., 2000*). Les

mécanismes impliqués sont inconnus, mais le NaP pourrait limiter la contraction musculaire et la réparation de la membrane des fibres endommagées pendant l'injection par précipitation du calcium intracellulaire et donc faciliter l'internalisation de l'ADN. Le NaP protégerait également l'ADN de l'action des DNAses. Enfin, il a été émis l'hypothèse que le NaP permettrait une amélioration de la distribution de l'ADN au sein du muscle squelettique.

Plusieurs autres facteurs semblent affecter l'efficacité de transfection de l'ADN nu dans le muscle squelettique, à l'échelle de l'animal :

Des expériences de Southern-blot montrent que la majorité des plasmides injectés sont dégradés rapidement mais un petit pourcentage de plasmide persiste sous forme circulaire (*Manthrope et al., 1993, Wolff 1991*). L'injection de plasmide linéarisé ou de grande taille permet une expression plus faible du transgène, probablement due à une dégradation favorisée (*Buttrick et al., 1992, Wolff et al., 1992*).

De forts niveaux d'expression sont obtenus chez la jeune souris Balb/C âgée de deux semaines et le jeune rat (*Danko et al., 1997*). De même, il a été démontré que l'application préalable d'agents myotoxiques avant injection intramusculaire résulte en une augmentation de l'efficacité de transfection *in vivo*. Les deux agents les plus utilisés sont la bupivacaine, un anesthésique local, et la cardiotoxine issue d'un venin de serpin "*Naja nigricollis*". L'utilisation de bupivacaine à une concentration de 0,5 à 0,75%, cinq à sept jours avant l'injection du plasmide permet une augmentation de 4 à 80 fois l'expression du transgène chez la souris et le rat (*Wells. 1993, Danko et al., 1994, Vitadello 1994*). La cardiotoxine à une concentration de 10 mM permet quant à elle une augmentation de l'efficacité du transfert de gènes de 2 à 10 fois (*Danko et al. 1994*). En revanche l'injection du plasmide juste après l'application de l'agent myotoxique (temps inférieur à trois jours) résulte en une diminution significative du transfert de gènes. Ces deux agents provoquent une destruction sélective des fibres musculaires par augmentation de la concentration du calcium intracellulaire et activation du complément (*Engel et al., 1982, Danko et al., 1994*). Cette destruction est suivie d'une régénération musculaire. Ce phénomène de régénération induit, pendant une à deux semaines après l'application, une revascularisation, une infiltration cellulaire, une phagocytose des fibres musculaires nécrotiques, une prolifération des cellules satellites et leur fusion en myotubes, et enfin la ré innervation du muscle (*Ontell et al., 1985, Carlson et al., 1988, Grounds et al., 1991*). Ces agents permettraient d'améliorer l'efficacité de transfection des fibres musculaires en réduisant la masse de tissu conjonctif entourant les fibres (*Davis et al., 1993*), et en créant un environnement prolifératif idéal pour l'entrée et le métabolisme intracellulaire de l'ADN (*Benoit et Belt 1970, Benoit et Belt 1972, Bischoff 1975, Jones, 1982, Saito et al., 1988*). La régénération musculaire induite par l'ischémie est également favorable pour l'expression du transgène (*Takeshita et al., 1996a, 1996 b, Tsurumi et al., 1996*).

Chez le rongeur, généralement les muscles comme le rectus femoris ou le tibialis anterior qui possèdent un épimysium bien défini permettent une bonne expression du transgène, probablement

parce qu'ils induisent une bonne bio-distribution associée à une bonne rétention du plasmide au niveau de la zone injectée (*Wolff et Budker., 2005*). Un des inconvénients majeurs de cette technique d'injection avec l'ADN nu est que l'efficacité de transfection diminue avec la taille croissante de l'animal. L'expression du transgène est moins élevée chez le rat et trois fois moindre chez le gros animal comme le primate comparativement à la souris (*Jiao et al., 1992*). Des marquages histologique et fluorescent indiquent que le primate présente plus de tissu conjonctif dans le périnysium par rapport au rongeur. Chez le primate, la distribution du plasmide serait limitée ainsi que les contacts avec le sarcolemme. Une autre explication serait que les primates possèdent 50% de noyaux par aire du muscle en moins que les rongeurs, réduisant ainsi l'efficacité de transcription du transgène.

Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'expression du transgène était indépendante du type de fibres musculaire (type I ou II), ces deux types de fibres sont capables de prendre en charge l'ADN et d'exprimer le transgène de façon similaire.

A l'heure actuelle, la faible expression du transgène induite par injection intramusculaire directe, sous-tend le développement de techniques plus efficaces pour délivrer l'ADN au sein des fibres musculaires. Le muscle squelettique est un organe richement vascularisé (*Browning et al., 1996*) et l'administration par voie vasculaire permet un contact de l'ADN avec toutes les fibres du muscle. La voie intravasculaire (intra-artérielle ou intra-veineuse) est une piste encourageante puisque ce mode de délivrance permet en effet une meilleure bio-distribution de l'ADN à travers l'espace interstitiel du muscle. Cependant, l'endothélium au niveau du muscle squelettique, contrairement au foie, est un endothélium continu de type nonfenestré et a la propriété d'être peu perméable aux solutés, et spécialement aux macromolécules comme l'ADN. La vitesse et le volume de la solution contenant l'ADN sont des facteurs limitant l'efficacité de transfection. En effet, pour obtenir une expression du transgène efficace, il est nécessaire d'appliquer une pression hydrodynamique par l'injection de large volume de la solution en un temps réduit (10 ml/minute dans la veine saphéine ou l'artère iliaque de rat) (*Budker et al., 1998, Hagstrom et al., 2004*). Si les systèmes artériels et veineux forment tous deux de larges réseaux au sein du muscle squelettique, le système veineux est préféré car les veines sont plus facilement accessibles (à travers la peau) que les artères et elles résistent mieux à la pression (*Hagstrom et al., 2004*). De plus, les veinules sont plus perméables aux macromolécules que les autres parties du micro-réseau vasculaire. L'administration préalable d'agents vasodilatateurs comme la papavérine permet d'augmenter la perméabilité vasculaire. Des œdèmes consécutifs à l'administration intravasculaire de l'ADN ont été observés chez les animaux, avec des infiltrats de cellules du système immunitaire (neutrophiles et macrophages) au niveau de l'interstice musculaire et une augmentation du taux de créatine kinase sérique, néanmoins ces œdèmes disparaissent dans les 24 heures suivant l'injection (*Toumi et al., 2006a, Toumi et al., 2006b*). Dans la plupart des études publiées, les expérimentateurs administrent également aux animaux des analgésiques comme l'acétaminophène de façon à limiter la douleur.

Ce mode d'administration a été utilisé avec succès chez le petit animal (souris et rat) comme chez le gros animal (primate) (*Hagstrom et al., 2004*) et dans le muscle sain ou pathologique (*Liang et al., 2004, Zhang et al., 2004a*, voir paragraphe 5.1).

La membrane cellulaire est une barrière semi-perméable qui contrôle les échanges de molécules entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Seul un nombre limité de molécules hydrophobes peut pénétrer dans le cytoplasme en traversant la bicouche lipidique, d'autres doivent pénétrer par l'intermédiaire de systèmes de transport spécifiques. Mais la plupart des molécules hydrophiles sont incapables de pénétrer dans la cellule, ce qui explique la faible efficacité de transfection de l'ADN soit par injection directe intramusculaire ou par injection intravasculaire. Dans ce contexte de transfert de gènes non viral, un des enjeux est de faire traverser l'ADN à travers cette barrière naturelle plus efficacement à l'aide de techniques physiques ou chimiques.

## ii. L'électroporation

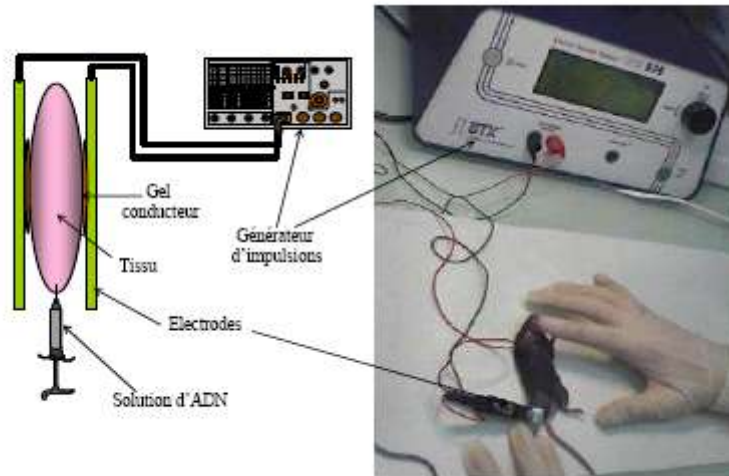
### • Principe et mécanismes d'action

Afin d'augmenter l'efficacité de transfection *in vivo*, l'administration d'ADN est généralement assistée par des techniques physiques comme l'électroporation.

En 1982, E. Neumann démontra pour la première fois que de l'ADN pouvait être introduit dans des cellules de souris en suspension grâce à des impulsions électriques (*Neuman et al., 1982*). Cette technologie est nommée électroporation ou électroperméabilisation. L'électroperméabilisation est une technique qui a pour effet de rendre les membranes cellulaires perméables temporairement par l'application d'impulsions électriques. La bicouche lipidique de la membrane plasmique est faiblement conductrice et sépare deux solutions ayant une très forte conductivité ionique, le cytoplasme d'une part et le milieu extracellulaire d'autre part. La différence de potentiel entre la membrane externe et la membrane interne d'une cellule est de l'ordre de 70mV. Lorsqu'un champ électrique externe est appliqué à une cellule, le courant résultant induit une accumulation de charges électriques sur la membrane cellulaire et module ainsi le potentiel transmembranaire de la cellule. Si le potentiel transmembranaire dépasse une valeur seuil, la membrane cellulaire se désorganise et des changements structuraux apparaissent. Brièvement, la différence de potentiel transmembranaire électroinduite dépend de plusieurs paramètres, dont les suivants:

- la forme de la cellule,
- la conductivité de la membrane,
- le rayon de la cellule,
- le champ appliqué et la durée d'application du champ électrique,
- l'angle entre la direction du champ et la normale à la tangente au point considéré sur la membrane,
- et le temps de charge de la cellule.

Ce n'est qu'à la fin des années 1990 que les premières études d'électroporation *in vivo* apparaissent. Cette technique efficace de transfert de gènes consiste à injecter une solution d'ADN dans le tissu cible et à appliquer une série d'impulsions électriques sur ce même tissu (Figure 5).



**Figure 5-Réalisation pratique de l'électrotransfert.**

La solution d'ADN est injectée dans le tissu cible et une série d'impulsions électriques est appliquée sur ce même tissu grâce à l'utilisation de deux électrodes et d'un générateur d'impulsions.

La plupart des études tendent à montrer que le mécanisme de l'électrotransfert *in vivo* est comparable au mécanisme *in vitro* et étendu à l'ensemble du tissu : l'électrotransfert est un mécanisme faisant intervenir la distribution de l'ADN, la perméabilisation de la cellule (atteinte au delà d'une valeur seuil de champ local), et le transfert d'ADN facilité par l'effet électrophorétique.

Un modèle suggère que l'électroperméabilisation conduit à la formation d'«électropores» relativement stables (Neuman *et al.*, 1982, De Gennes., 1999). L'ADN plasmidique pourrait éventuellement passer la membrane après une étape de liaison à la surface de la cellule puis diffuser. Cependant ces pores n'ont jamais pu être visualisés.

Une autre théorie suggère que l'ADN plasmidique passe à travers la membrane pendant l'application des impulsions électriques, et ceci grâce à des forces électrophorétiques associées au champ électrique. Cet effet électrophorétique a été montré lors de différentes études :

- Klenchin *et al.* ont démontré la nécessité de la présence de l'ADN au moment de l'application du champ électrique (Klenchin *et al.*, 1991).

- Une étude de microscopie de fluorescence à l'échelle de la cellule (Golzio *et al.*, 2002) a révélé que des impulsions électriques de l'ordre de la milliseconde induisaient une interaction entre la membrane électroperméabilisée et l'ADN. Une accumulation de plasmide fluorescent a été observée au contact de la membrane cellulaire sans pour autant immédiatement se déplacer dans le cytosol. Ainsi l'ADN doit être présent pendant les impulsions et l'électrophorèse induite par le champ favoriserait son insertion dans la membrane, mais l'ADN ne franchit la membrane électroperméabilisée que dans la minute suivante (Golzio *et al.*, 2004). Le même groupe a récemment

démontré la relation directe entre l'interaction ADN/membrane et l'efficacité de transfection : une augmentation de la surface de contact entre l'ADN et la membrane conduit à une plus forte expression (Faurie *et al.*, 2004).

-En 1999, Mir *et al.* ont également montré que des impulsions électriques permettaient d'augmenter le transfert de gènes dans le **muscle squelettique *in vivo*** non seulement par un effet de perméabilisation de la cellule mais également par un effet direct sur l'ADN permettant sa migration et son entrée dans la cellule (Mir *et al.*, 1999). Ils ont étudié d'une part l'incorporation du <sup>51</sup>Cr-EDTA radioactif, comme marqueur de la perméabilisation des fibres musculaires, et d'autre part l'expression du transgène, comme preuve de l'entrée de l'ADN. Ils ont montré que l'ajout de <sup>51</sup>Cr-EDTA peu de temps après les impulsions électriques permettait la pénétration du marqueur radioactif alors que l'ajout d'ADN après les impulsions électriques ne permettait plus l'entrée de l'ADN.

-De même, Bureau *et al.* ont montré que l'électrotransfert *in vivo* était efficace grâce à la combinaison des deux phénomènes : un effet électroperméabilisant sur la cellule et un effet électrophorétique sur l'ADN (Bureau *et al.*, 2000). Pour montrer cela ils ont étudié le transfert de gènes dans le muscle squelettique de souris en combinant d'une part des impulsions électriques de faible voltage (LV (80V/cm, 80ms), non perméabilisantes) mais de longue durée (effet électrophorétique) et d'autre part des impulsions électriques de haut voltage mais de courte durée (HV (800V/cm; 0,1ms), perméabilisantes). Seule la combinaison d'une impulsion HV suivie d'une impulsion LV a conduit à un transfert de gènes élevé. Une étude plus récente a confirmé que le rôle des impulsions HV est limité à la perméabilisation de la cellule, alors que celui des impulsions LV est limité à l'effet électrophorétique sur l'ADN (Satkauskas *et al.*, 2002).

Mais la déstabilisation de la membrane cellulaire et l'effet électrophorétique sur l'ADN ne sont sans doute pas les seuls mécanismes contribuant au transfert de l'ADN dans la cellule. Par exemple, Rols *et al.* ont évoqué l'importance de métabolismes énergétiques (ADP et ATP) pour le passage de l'ADN à travers la membrane et sa migration jusqu'au noyau (Rols *et al.*, 1998). Satkauskas *et al.* ont quant à eux proposé un mécanisme de transport de l'ADN par endocytose médié par un récepteur, mais ce mécanisme ne peut pas expliquer le bénéfice de l'électrotransfert par rapport à l'ADN nu (Satkauskas *et al.*, 2001). Dans cette même étude, ils ont montré que le niveau d'expression du gène d'intérêt était maintenu en appliquant les impulsions jusqu'à 4 heures après l'injection d'ADN, bien que d'autres études aient montré que la plupart de l'ADN injecté soit éliminé au bout de 4 heures (Cappelletti *et al.*, 2003). Une autre étude a confirmée qu'après une injection intramusculaire, la majeure partie de l'ADN est rapidement dégradée et éliminée (Bureau *et al.*, 2004). Une infime partie de l'ADN est préservée et constituerait un réservoir d'ADN électrotransférable et stable.

## • Facteurs limitants

### *Electrodes et champ électrique*

Le choix des électrodes est un facteur limitant qui dépend du tissu cible et de la taille de l'animal traité. Lors d'un électrotransfert sur petit animal dans un tissu tel que le muscle squelettique, la majorité des expérimentateurs utilisent des électrodes composées de deux plaques attachées à une pince. En effet ce type d'électrode peut être facilement appliqué en externe de chaque côté du tissu d'intérêt. Pour des animaux de plus grosse taille, les électrodes aiguilles sont plus souvent utilisées, car les électrodes plaques nécessiteraient un champ électrique trop fort (du fait de l'écart important entre les électrodes). Plus précisément, l'intensité et de la distribution du champ électrique sont des paramètres très importants, pour obtenir d'une part un transfert de gènes efficace mais également une toxicité réduite. La distribution du champ électrique dépend du tissu et du type d'électrodes entraînant ainsi une variation de l'intensité effective du champ (en V/cm) dans la zone traitée (*Gehl et al., 1999*).

### *Toxicité*

Les conditions optimales de l'électrotransfert d'ADN, résultent d'un compromis entre l'efficacité du transfert d'ADN et une toxicité minimale au niveau cellulaire (*McMahon et al. 2001*). La toxicité fait intervenir différents paramètres mais la perméabilisation est le principal. Ce paramètre de toxicité peut être réduit quand la durée et le niveau de perméabilisation sont minimaux.

Un autre facteur de toxicité est le stress oxydatif dû à la génération de radicaux libres induite près de la membrane électroperméabilisée (*Bonnafous et al., 1999*).

Il a également été montré que l'électrotransfert induisait des lésions musculaires dépendantes de la quantité d'ADN injectée avec l'apparition de myofibres nécrotiques (*Hartikka et al., 2001*). Une autre étude récente confirme ce résultat, suggérant que les dommages associés à l'électrotransfert seraient principalement dus à la présence et à l'expression intracellulaire du plasmide (*Durieux et al., 2004*). Une étude moléculaire de la réaction des cellules musculaires à l'application de champs électriques a été réalisée et a permis de constater que l'application de champs électriques optimisés pour le transfert de gène n'induisait pas l'expression de gènes marqueurs de stress et de toxicité dans les cellules (*Rubenstrunk et al., 2004*). Dans le cas des fibres musculaires, sept à dix jours semblent nécessaires pour retrouver un état physiologique normal.

### *Type de muscle et espèces animales*

Selon le type de muscle, l'espèce et l'âge de l'animal, il est nécessaire de déterminer les valeurs seuil du champ électrique : seuil réversible (perméabilisation) et seuil irréversible (dommage cellulaire) pour obtenir les conditions électriques optimales pour un transfert de gènes avec le minimum d'effets toxiques. Généralement, les muscles de rongeurs présentent une résistance plus grande que ceux du porc, et la résistance des porcs âgés est plus grande que celle des jeunes animaux (*Khan et al., 2005*). Une étude menée par Draghia et al., a montré que l'électrotransfert des grands muscles comme le



*longissimus dorsi* chez le porc permet une expression supérieure par rapport à d'autres muscles (Draghia-Akli *et al.*, 2006).

Ces auteurs ont également montré de façon intéressante que la quantité d'ADN nécessaire pour une efficacité optimale du transfert de gène était cent fois plus faible que la quantité théorique calculée et extrapolée à partir des résultats obtenus chez le rongeur (Draghia-Akli *et al.*, 2003). Ces résultats montrent même au contraire que l'utilisation d'une quantité trop importante d'ADN induit des effets secondaires indésirables, comme la toxicité et le développement d'anticorps dirigés contre le produit du transgène et sont très prometteurs pour envisager des essais cliniques.

### *Bio-distribution*

Différentes études ont montré l'importance de l'accessibilité de l'ADN aux cellules cibles. Une meilleure distribution peut être obtenue par exemple par la pré injection d'une solution de sucrose qui crée des espaces entre les fibres musculaires (Davis *et al.*, 1993), ou encore avec un pré traitement à la hyaluronidase (Mennuni *et al.*, 2002), une enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique, un constituant majeur de la matrice extracellulaire (Favre *et al.*, 2000). Par exemple, Molnar *et al.* ont montré par histochimie, une augmentation de la zone du muscle transfectée de 150 à 370 % grâce à un pré traitement à la hyaluronidase avant l'électrotransfert chez la souris (Molnar *et al.*, 2004). Ce pré traitement à la hyaluronidase permet d'utiliser, pour un même niveau d'expression, des voltages plus faibles et donc de réduire les dommages musculaires (McMahon *et al.*, 2001, Gollins *et al.*, 2003, Scherzter *et al.*, 2006). Remarquons qu'en revanche, un pré traitement à la hyaluronidase n'a aucun effet sur le taux d'expression d'un transgène après injection intramusculaire d'ADN nu (Mennuni *et al.*, 2002). Inversement, contrairement à l'injection intramusculaire d'ADN nu, l'efficacité du transfert de gène médiée par l'électroporation est diminuée lorsque le muscle subit un pré traitement avec la bupivacaine (Wong *et al.* 2005), ces résultats tendent à montrer que seuls les myotubes matures sont transfectés dans ces conditions.

Enfin, le poly-L-glutamate est utilisé dans le muscle électroporé de souris pour augmenter l'expression d'un transgène. Il s'agit d'un polymère anionique qui semble augmenter l'internalisation du plasmide à l'intérieur de la cellule et/ou réduire sa dégradation (Nicol *et al.*, 2002). De même, d'autres polymères comme le SP1017 et le polymère P188 sont utilisés en combinaison avec l'application du champ électrique pour augmenter l'efficacité de transfection et réduire les dommages tissulaires (Hartikka *et al.*, 2001, Franquesa *et al.*, 2005).

### **iii. La sonoporation**

Cette technique consiste à appliquer des ultrasons pour perméabiliser les membranes des cellules et ainsi augmenter la pénétration des molécules. Cette technique a été utilisée pour le transfert de gènes pour la première fois dans les années 1980 (Fechheimer *et al.*, 1987) et plusieurs équipes ont plus récemment montré que cette technique était efficace pour améliorer l'efficacité du transfert de l'ADN

dans le muscle squelettique (Aoyama *et al.*, 2002, Danialou *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2003a, Schratzberger *et al.*, 2002, Taniyama *et al.*, 2002).

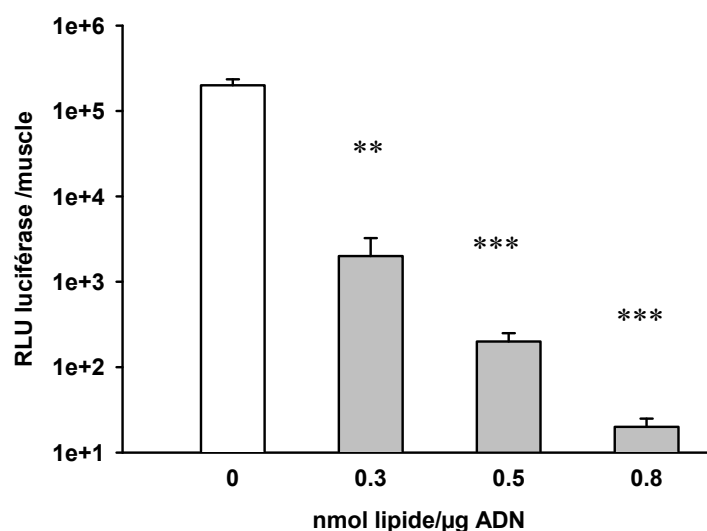
L'ADN nu est en général co-injecté avec des microbulles (1 à 3  $\mu\text{m}$ ) constituées de protéines, de lipides ou de polymères et remplies d'air ou de gaz (Lu *et al.*, 2003a). Les microbulles les plus recensées dans la littérature sont les microbulles Optison<sup>TM</sup>, constituées de perfluoropropane encapsulé dans une sphère d'albumine humaine.

Le mécanisme de la sonoporation n'est pas totalement élucidé mais pourrait être expliqué par la cavitation acoustique. La propagation d'ultrasons dans un liquide crée des phases de compression et de dépression d'un élément de liquide. Si l'amplitude de la phase stationnaire est suffisamment grande, des bulles vont se former au sein même de la phase liquide, croître pour finalement imploser : c'est la cavitation. Cette cavitation acoustique entraîne une perturbation mécanique et la libération d'énergie associée pourrait perméabiliser les membranes cellulaires au voisinage. L'ajout de microbulles lors du transfert d'ADN permet d'augmenter les sources de cavitations : la destruction de chaque microbulle crée une réaction en chaîne de cavitation (Deng *et al.*, 2004).

Cependant, l'efficacité de transfection par sonoporation reste faible dans le muscle squelettique (Liang *et al.*, 2004b), c'est pourquoi l'application d'ultrasons peut être envisagée en combinaison avec l'utilisation de vecteurs chimiques très efficaces et non toxiques pour le transfert de gènes *in vivo*, tels que les copolymères à blocs. En effet Chen *et al.*, ont montré que deux copolymères, le L61 et le P85 permettaient à la fois d'augmenter l'efficacité de transfection et de réduire la toxicité cellulaire induite par les ultrasons (Chen *et al.*, 2006).

### 3. Transfert de gènes dans le muscle squelettique à l'aide de polymères.

Afin d'augmenter l'efficacité de transfection *in vivo*, l'administration d'ADN peut également être assistée par des vecteurs chimiques. Les premiers vecteurs synthétiques chimiques développés pour le transfert d'ADN ont essentiellement été les lipides et les polymères cationiques ou polycations (Zhang *et al.*, 2004b). Ces vecteurs sont capables de lier et de condenser l'ADN, de le protéger de l'action des DNases, et enfin de faciliter son transport dans les cellules, ceci résultant en une augmentation de l'expression du transgène (Felgner *et al.*, 1994, Godbey *et al.*, 1999, Suh *et al.*, 2003, Uyechi *et al.*, 2001). Cependant si ces vecteurs sont très efficaces *in vitro*, ils se sont rapidement avérés inefficaces pour le transfert de gène *in vivo* et notamment dans le muscle squelettique. En effet, plutôt que d'augmenter l'efficacité du transfert d'ADN, au contraire ils inhibent l'expression du transgène après injection intramusculaire (Figure 6).



**Figure 6-Inhibition dose-dépendance des lipides cationiques pour le transfert de gènes *in vivo* (données personnelles).**

Le gène codant la luciférase est injecté par voie intramusculaire en absence ou en présence de quantité croissante de lipides cationiques (0 à 0.8 nmol lipide/μg d'ADN injecté) dans le tibia antérieur de souris. Sept jours après l'injection, les muscles sont prélevés, broyés et l'activité luciférase est mesurée par luminométrie. Les histogrammes correspondent à la moyenne de six muscles. Les astérisques indiquent les différences significatives avec \*\*  $p < 0,05$  et \*\*\*  $p < 0,001$  entre les muscles injectés avec l'ADN nu et l'ADN formulé avec les lipides cationiques.

Fort de ces résultats, de nouvelles classes de vecteurs synthétiques ont été développées et sont aujourd'hui de plus en plus étudiées pour le transfert de gènes *in vivo* dans divers organes dont le muscle squelettique. Il s'agit de systèmes de délivrance de gènes basés sur l'utilisation de nouveaux polymères.

### 3.1. Les PINCs

Développés par Mumper en 1996, le PVA (polyvinyl alcohol) et le PVP (polyvinylpyrrolidone) sont deux polymères efficaces pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique de rongeurs (*Mumper et al., 1996, Anwer et al., 1998, Alila et al., 1997, Shiotani et al., 1999*).

Ces vecteurs possèdent quelques caractéristiques particulières : (i) Ils formeraient essentiellement des interactions de type liaisons hydrogènes entre le squelette vinyl et l'ADN en milieu salin, (ii) ils auraient un rôle protecteur vis à vis de l'ADN, et (iii) contrairement aux autres vecteurs chimiques développés à ce jour, ils ne condensent pas l'ADN. Pour toutes ces raisons, ils font partie de la famille des PINC (protective, interactive, non-condensing delivery system) (*Mumper et al., 1998*). Après interaction avec l'ADN, les PINCs recouvriraient la macromolécule d'ADN d'une surface hydrophobe qui protégerait l'ADN de l'action des DNAses (*Mumper et al., 1996, Mumper et al., 1998*). Il a également été démontré que ces polymères permettaient la libération progressive de l'ADN intact, favorisant ainsi une très bonne bio-distribution de l'ADN sur des périodes prolongées, et favorisaient l'internalisation de l'ADN probablement par choc osmotique (*Mumper et Rolland., 1998*).

Ces vecteurs chimiques bien que simples d'utilisation et peu toxiques ne sont pas pour autant aussi efficaces que la technique d'électrotransfert pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique. C'est pourquoi dans le domaine du transfert de gènes à l'aide de procédés chimiques de récents vecteurs plus efficaces ont été développés.

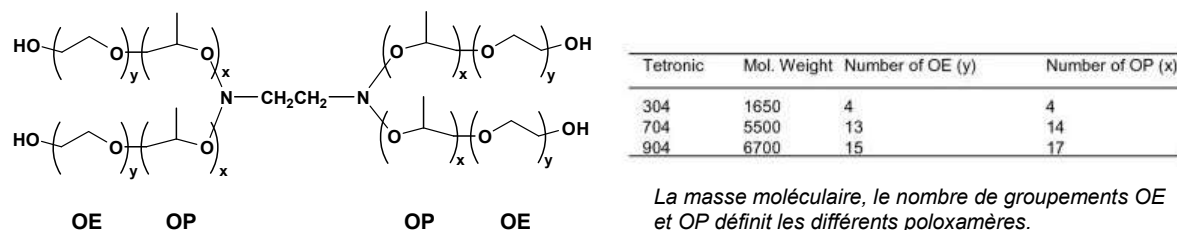
### 3.2. Les copolymères à blocs

#### a. Définition

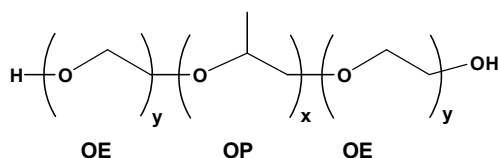
Les copolymères à blocs sont des molécules synthétisées et purifiées par BASF, NJ, USA. La synthèse est réalisée par addition séquentielle de monomère d'oxyde de propylène (OP) et d'oxyde d'éthylène (OE) en présence d'un catalyseur alcalin.

Les copolymères à blocs sont recensés par les pharmacopées américaine et britannique sous le nom de poloxamères ou pluronics<sup>®</sup> (copolymères à blocs non ioniques) et de poloxamines ou tétronics<sup>®</sup> (copolymères à blocs ioniques). Il existe plus de 50 polymères différents.

Les poloxamines sont des copolymères à bloc amphiphiles constitués de plusieurs branches (comprenant les groupements hydrophobes d'oxyde de propylène OP et hydrophiles d'oxyde d'éthylène OE) reliées entre elles par un groupement éthylènediamine central chargé positivement :



Les poloxamères sont des copolymères à bloc amphiphiles constitués de blocs hydrophiles d'oxyde d'éthylène (OE) et hydrophobes d'oxyde de propylène (OP) arrangés selon une structure triséquencée de type A-B-A : EO<sub>x</sub>-OP<sub>y</sub>-EO<sub>x</sub> :

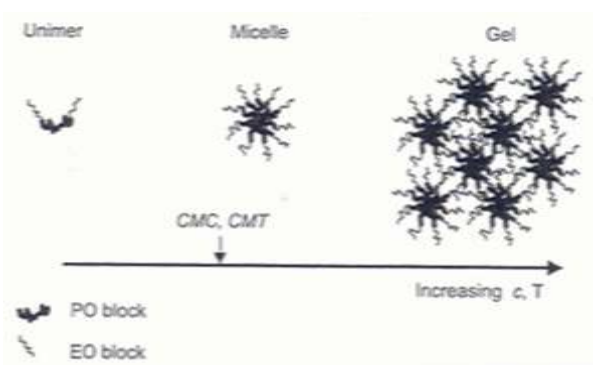


Le nombre de blocs assemblés x et y définit un nombre important de poloxamères avec des tailles, des comportements hydrophiles et lipophiles différents (Batrakova *et al.*, 2003). Les poloxamères sont en effet caractérisés par leur masse molaire (MW), leur balance hydrophile-lipophile (HLB) et leur concentration micellaire critique (CMC). La nomenclature correspond à des lettres F (pour solide), P (pour pâte) ou L (pour liquide) suivies de deux ou trois numéros qui correspondent à des paramètres structuraux (Tableau 1). Le dernier chiffre représente le pourcentage molaire des unités OE par rapport à la masse molaire totale du polymère. Le premier ou les deux premiers chiffres multipliés par 300 représentent la masse moléculaire des blocs OP.

Poloxamère	Masse molaire	Nombre d'unités OE	Nombre d'unités OP	HLB	CMC (μM)
P184 (L64, PE6400)	2900	26	30	15	480
P188 (F68, Lutrol)	8400	152	28	29	480
P85	4600	52	39	16	6500
P407 (F127)	12 600	200	65	22	2.8

**Tableau 1-Caractéristiques physico-chimiques de certains poloxamères à 37°C.**  
(Modifié d'après Kabanov *et al.*, 2005)

En effet, les poloxamères existent sous formes différentes en solution. Pour des concentrations en dessous de la concentration micellaire critique (CMC), les poloxamères se dispersent en solution sous forme d'unimère, en revanche pour des concentrations au delà de la CMC, les unimères s'agrègent et forment majoritairement des micelles grâce à des interactions hydrophobes (Figure 7). Ces micelles sont communément représentées par des sphères composées d'un coeur hydrophobe d'OP et une couronne externe hydrophile d'OE (Kabanov *et al.*, 2002 , Lemieux *et al.*, 2000).



**Figure 7-Structure des copolymères à blocs selon la concentration micellaire critique CMC et la température micellaire critique CMT.**

(D'après Kabanov *et al.*, 2005)

En solution aqueuse, la formation des micelles est également dépendante de la température. En dessous de la température micellaire critique (CMT), les poloxamères sont hydratés et relativement solubles, en revanche lorsque la température augmente, les groupements OP se déshydratent et deviennent insolubles permettant ainsi la formation de micelles. Lorsque la température augmente encore et pour des valeurs seuils de concentration, on peut observer la formation de gels. Pour la plupart des poloxamères, la CMT est comprise entre 25 et 40°C, c'est à dire en dessous ou proche de la température corporelle. La structure du polymère a de profonds effets sur les processus de micellisation et de gélification. Plus le nombre de groupements d'OP est grand, plus la formation de micelles et de gels apparaît tôt, cela se traduit par des valeurs de CMC et de CMT plus faibles. Au contraire plus le nombre de groupements d'OE est grand, moins les unimères auront tendance à s'agréger.

## **b. Applications et activités biologiques**

Depuis les années 1950, ces molécules sont utilisées pour une variété d'applications pharmaceutiques et biomédicales (Tableau 2) (Moghimi *et Hunter.*, 2000). Par exemple certains poloxamères peuvent être utilisés en pharmacie comme excipients permettant d'augmenter la stabilité de la durée de vie de certaines drogues ou molécules hydrophobes dans la circulation générale. Des études récentes ont montré que le poloxamère P188 permet une augmentation de la biodisponibilité de certaines drogues dans le cerveau après administration par voie orale et ce grâce à l'interaction de ces drogues avec le

cœur des micelles formées par le poloxamère, par l'intermédiaire de liaisons non covalentes (Batrakova et al., 2002, Kabanov et al., 2002).

Polymère	Applications
<b>Poloxamères</b>	
P188	activités antithrombotique et hémorragique, réparation de la membrane cellulaire, activation phagocytaire (stimulation phagocytose et production de super anions superoxides) et dégranulation neutrophile, inhibition de la résistance aux multidrogues, activités adjuvantes
P401	Inhibition de la résistance aux multidrogues, activités adjuvantes
P402	Idem 401
P407	Formation de particules circulantes, relarguage de drogues à partir d'une structure gélifiée, stimulation des macrophages, stimulation de la production d'EGF (epidermal growth factor)
<b>Poloxamines</b>	
tétronic904	Stimulation des macrophages
tétronic908	Formation de particules circulantes et stimulation des macrophages

**Tableau 2- Applications pharmaceutiques et biomédicales de certains copolymères à blocs.**  
(D'après Moghimi et Hunter, 2000)

Les copolymères à blocs sont dotés d'activités biologiques (pour revue, Moghimi et Hunter 2000).

Dans certaines émulsions eau-huile, les poloxamères présentent des propriétés adjuvantes. Il a été démontré que l'addition de copolymères à blocs, administrés par voie intraveineuse, en présence d'antigènes permettait d'amplifier les réponses immunes humorales et cellulaires contre les antigènes. L'activité adjuvante des copolymères à blocs semble être influencée par la taille et le contenu en groupements OE. L'activité maximale a été obtenue avec des copolymères dont la taille moléculaire varie de 10 à 12 kDa et dont le nombre de groupement OE représente entre 5 et 15%. De plus, le contenu en groupements OP semblerait diriger le type de réponse immune, par exemple, les copolymères avec 10% de groupements OP augmentent de façon significative les réponses lymphocytaires de type TH<sub>2</sub>, alors que les copolymères pauvres en groupements OP induisent à la fois des réponses lymphocytaires de type TH<sub>1</sub> et TH<sub>2</sub>. Le ou les mécanismes par lesquels les copolymères auraient un rôle adjuvant restent encore à élucider mais il semble qu'ils faciliteraient le chargement des peptides antigéniques sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité CMH de classe II des macrophages et des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) en déstabilisant leurs membranes plasmiques ou la membrane des vacuoles (pinosomes ou phagolysosome). En effet, le P188 (F68 ou Lutrol) a été décrit comme pouvant stimuler l'activité phagocytaire des neutrophiles humains et des macrophages tissulaires de rongeurs (Ingram et al., 1992, Moghimi et Gray., 1997). Ces polymères seraient également capables d'activer la cascade du complément par la voie du facteur de complément C3 (Hunter et Bennett., 1984, Vercellotti et al., 1982), ces données sont à prendre en considérations mais il semblerait que l'activation du complément puisse être liée au degré d'impureté du polymère en solution (Moghimi et Hunter 2000). Une étude a montré que ce même poloxamère en facilitant la réparation membranaire préviendrait les phénomènes de nécrose cellulaire dans les fibres musculaires squelettiques après radiations ionisantes (Greenebaum et al., 2004). En effet, certains poloxamères sont utilisés pour le traitement de grands brûlés. Ils possèderaient la faculté de faciliter le

renouvellement membranaire des cellules lésées après brûlure. Ils entrent même dans la composition de certaines crèmes réparatrices. Plusieurs préparations à base de poloxamères sont utilisées en conditions post-opératoires pour limiter les surfaces d'adhésion des tissus.

Le poloxamère P188 jouerait également un rôle neuroprotecteur (inhibition de l'apoptose et prévention de la nécrose par inhibition indirecte de la MAPkinase p38 après un traumatisme mécanique (*Serbest et al., 2006*). Des études récentes ont montré que les poloxamères inhibent les mécanismes de résistance aux drogues. Les polymères en se liant aux membranes cellulaires, altèrent la viscosité membranaire, et inhibent certaines protéines membranaires telle que la P-glycoprotéine (Pgp) (*Batrakova et al., 2001a, Batrakova et al., 2001b, Batrakova et al., 2003*). En plus d'augmenter la bio-disponibilité de certaines drogues, ils induisent en plus une sensibilisation des tumeurs dites multidrogues résistantes (MDR) (*Batrakova et al., 2002, Kabanov et al., 2002*).

Enfin, une étude intéressante menée par Yasuda et al., montre que les poloxamères administrés par voie intraveineuse améliorent les fonctions hémodynamiques et myocardiques chez la souris myopathe en stabilisant les membranes cellulaires des myocytes (*Yasuda et al., 2005*).

### c. Copolymères à blocs et transfert de gènes

A partir des années 2000, l'utilisation de ces composés s'est étendue au transport de macromolécules, comme l'ADN et ils sont aujourd'hui reconnus à part entière comme une nouvelle classe de vecteurs synthétiques aussi efficace que l'électrotransfert pour le transfert de gènes non viral *in vivo* dans divers organes dont le cœur (*Pitard et al., 2004*), les poumons (*Desigaux et al., 2005*), le muscle squelettique (*Pitard et al., 2002, Pitard et al., 2004*), les yeux (*Liaw et al., 2001*), ou encore les intestins (*Chang et al., 2004*).

Historiquement, les poloxamères ont d'abord été utilisés pour augmenter l'efficacité de transfection des adénovirus et des lentivirus (*Maillard et al., 2000, Dishart et al., 2003*). Le poloxamère 407 (Pluronic F127) est effectivement employé pour cet effet, et il a été démontré que le gel formé par le poloxamère sert de réservoir pour les virus et permet donc l'augmentation de l'efficacité du transfert de gènes en maintenant une concentration suffisante de vecteurs autour des cellules cibles (*March et al., 1995*).

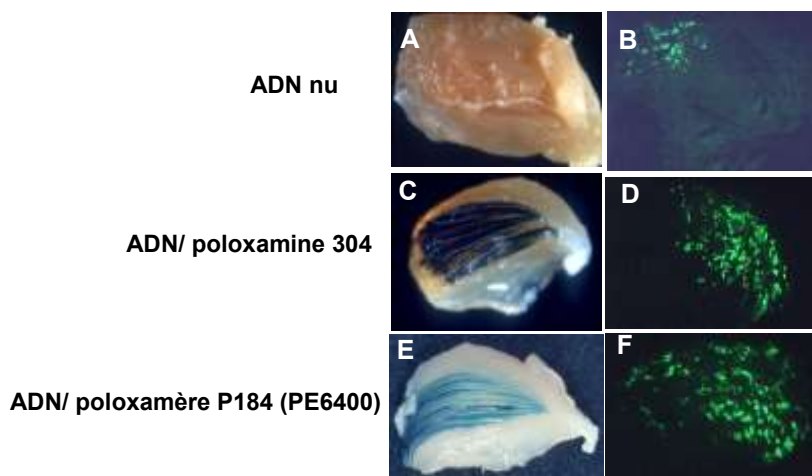
Ensuite, des études ont montré que ces vecteurs co-delivrés avec des polymères cationiques permettaient d'améliorer le transfert de gènes *in vitro* (*Gebhart et al., 2002*). Dans ce cas, il a été suggéré que le poloxamère pouvait faciliter l'internalisation des complexes polymères cationiques/ADN par endocytose et le relargage des macromolécules des compartiments endocytaires vers le cytoplasme de la cellule (*Astafieva et al., 1996*). Dans cette étude, les auteurs supposent que le poloxamère interagit avec les sites hydrophobes des polyplexes formés de l'ADN et du polymère cationique. Kuo et al., ont également montré que les poloxamères à une certaine concentration (1 à 3 % v/w dans l'eau) réduisaient l'inhibition du transfert de gènes médiée par les polyplexes



polyéthylèneimine PEI/DNA (Kuo *et al.*, 2003). En effet, les polyplexes ont une charge globale positive, ils se fixent aux protéines sériques du milieu de culture par interactions électrostatiques et s'agrègent, il en résulte une inhibition du transfert de gènes. L'addition de poloxamères limite cette inhibition. Les poloxamères s'inséreraient dans les lipoplexes, les chaînes hydrophiles d'oxyde d'éthylène des poloxamères provoqueraient une dispersion des lipoplexes et préviendraient ainsi leur agrégation (Pitard *et al.*, 2001).

Puis, il a été montré que les poloxamères en association avec une méthode physique non virale traumatisante de type électroporation (Lee *et al.*, 1992, Hartikka *et al.*, 2001) ou sonoporation (Lee *et al.*, 1992, Lu *et al.*, 2003a) permettaient d'augmenter l'efficacité de transfection *in vivo* et de réduire les dommages tissulaires (Chen *et al.*, 2006).

Enfin, il a été démontré que les copolymères à blocs pouvaient à eux seuls augmenter l'expression de l'ADN nu après injection intramusculaire d'un mélange copolymère à blocs/ADN (Lemieux *et al.* 2000, Pitard *et al.*, 2002, Pitard *et al.*, 2004, Kabanov *et al.*, 2005) (Figure 8).



**Figure 8-Transfert de gènes dans le muscle squelettique à l'aide de copolymères à blocs.**

Les gènes codant la  $\beta$ -galactosidase (colonne de gauche) ou la Green Fluorescent Protein (GFP) (colonne de droite) sont injectés dans le tibial antérieur de souris en absence (A et B) ou en présence de poloxamine 304 à 5% (C et D) ou de poloxamère P184 (Pluronic L64 ou PE6400) à 0.05% (E et F). L'activité ou la détection des protéines est réalisée 7 jours après l'injection intramusculaire.

#### **d. Mécanisme(s) d'action pour le transfert de gènes**

Le mécanisme d'action de ces nouveaux vecteurs synthétiques pour le transfert de gènes n'est pas élucidé à l'heure actuelle mais quelques résultats expérimentaux nous permettent d'émettre des hypothèses.

##### ***Interactions et condensation de l'ADN***

L'ADN interagirait avec les copolymères à blocs par des liaisons faibles de types hydrogène avec les groupements OE et OP. Selon les données de la littérature, l'interaction entre l'ADN et les polymères aboutirait ou non à une condensation de l'ADN (*Liaw et al., 2001, Chang et al., 2004, Kabanov et al., 2005*).

De façon intéressante, il a été montré au laboratoire que le mélange copolymère à blocs/ADN n'est efficace qu'à l'unique condition que l'ADN soit formulé avec le vecteur avant l'injection intramusculaire, des injections successives de l'ADN et du polymère et vice-versa n'ont aucun effet sur l'expression du transgène (*Pitard et al., 2002*).

##### ***Mécanisme(s) d'action***

Remarquons que les copolymères à blocs utilisés seuls avec l'ADN sont inefficaces pour le transfert de gènes *in vitro*, ceci sous-tend que la matrice extracellulaire est sûrement d'une importance fondamentale pour l'efficacité de ces vecteurs *in vivo*.

De nombreux travaux ont montré que les poloxamères étaient capables de s'incorporer dans les bicouches lipidiques de façon à stabiliser ou réparer des membranes lésées (*Maskarinec et al., 2002, Wu et al., 2005, Greenebaum et al., 2004, Yasuda et al., 2005*). Il a été envisagé et démontré que ces vecteurs induiraient des transitions structurales de la membrane associées à une diminution de la viscosité membranaire, à une augmentation du taux de "flip-flop" lipidique (*Krylova et al., 2003*). Ces effets auraient pour rôle de faciliter le transport des ions et des solutés à travers la membrane par la formation éventuelle de pores membranaires (*Erukova et al., 2000, Krylova et Pohl., 2004, Krylova et al., 2003*). Les poloxamères pourraient également faciliter l'internalisation de l'ADN par fusion membranaire au niveau de la membrane du sarcolemme et/ou pourraient aussi faciliter la sortie de l'ADN des endosomes précoces vers le cytoplasme limitant ainsi les phénomènes de dégradation de l'ADN dans les endosomes tardifs et les lysosomes.

Les copolymères à blocs faciliteraient également la distribution tissulaire de l'ADN et augmenteraient le transport de l'ADN du cytoplasme vers le noyau de la cellule musculaire (*Pitard et al., 2002*). Des micro injections cytoplasmiques d'un plasmide codant un gène rapporteur formulé avec le poloxamère P184 (Pluronic L64 ou PE6400) augmentent le pourcentage de cellules exprimant le transgène par rapport à l'injection d'ADN seul, et aucune différence significative n'est observée lorsque le mélange est directement micro-injecté dans le noyau. Ces résultats suggèrent bien que les copolymères jouent un rôle dans le transport de l'ADN du cytoplasme vers le noyau.

Récemment, des travaux dirigés par Kabanov ont démontré que certains poloxamères auraient des effets promoteur-dépendants dans le muscle squelettique de souris (Yang et al., 2005, Sriadibhatla et al., 2005). Des plasmides codant le gène de la luciférase sous la dépendance des promoteurs CMV ou NFκB et formulés avec des poloxamères induisent une augmentation du transfert de gènes équivalente à l'injection d'ADN nu, en revanche lorsque le gène est sous la dépendance des promoteurs SV-40, AP-1 ou CRE, l'augmentation du transfert de gène par rapport à l'ADN nu est abolie. Ces résultats suggèrent que certains poloxamères dont le Pluronic P85 et L64 affecteraient certains signaux de signalisation, en particulier la voie de signalisation faisant intervenir le facteur de transcription NFκB, qui joue un rôle central dans la régulation des défenses cellulaires et des réponses immunes. Le facteur de transcription NFκB activé viendrait se fixer sur le promoteur du transgène facilitant ainsi l'import nucléaire du plasmide.

*En 2004, cinq poloxamères ont été reconnus par la pharmacopée américaine pour des administrations IV, IM ou orale: le poloxamère 124 (Pluronic L44), le poloxamère 188 (Pluronic F68, Lutrol), le poloxamère 237 (Pluronic F87), le poloxamère 338 (Pluronic F108), et le poloxamère 407 (Pluronic F127).*

*Et en 2005, un essai clinique de transfert de gènes de phase I a débuté avec le poloxamère 188 (Pluronic F68 ou Lutrol). Cet essai consiste à transférer le muscle squelettique avec un plasmide codant le facteur proangiogénique Del-1 pour le traitement des ischémies des membres inférieurs.*

## 4. Stabilité de l'expression génique après transfert de gènes non viral.

Plusieurs facteurs importants (outre le vecteur non viral utilisé) influencent l'efficacité et la longévité de l'expression du gène après injection dans le muscle squelettique.

### 4.1. Les motifs CpG non méthylés

Bien que l'ADN nu, en tant que tel, ne provoque pas de réponse immunitaire spécifique, la présence de motifs CpG non méthylés sur les séquences bactériennes favorise les réponses inflammatoires et immunitaires *in vivo* (Krieg., 1999). Ceci représente un avantage pour les applications de vaccination mais un inconvénient pour les traitements de maladies par thérapie génique. Une approche alternative consiste à utiliser des plasmides délétés en motifs CpG non méthylés (Thacker *et al.*, 2005) ou encore des mini-plasmides circulaires, délétés pour la majorité des éléments plasmidiques superflus pour l'expression du transgène, contenant ainsi presque uniquement que la cassette d'expression (Darquet *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2003).

### 4.2. Promoteurs dirigeants l'expression du transgène

Le choix du promoteur est également d'une importance capitale. La plupart des études utilisent des cassettes d'expression contenant des promoteurs viraux tels que le promoteur du cytomégalo virus (CMV), du virus Rous Sarcoma (RSV) et du Simian virus (SV40). Le promoteur CAG qui consiste en la fusion de l'enhancer du CMV, du promoteur et du premier intron de la  $\beta$ -actine de poulet a une activité équivalente voire supérieure au CMV dans certains types cellulaires (Niwa *et al.*, 1991, Xu *et al.*, 2001). Les inconvénients d'utiliser des promoteurs viraux seraient d'une part l'obtention d'une expression très forte du transgène dans tous les types cellulaires (cellules musculaires et cellules environnantes : cellules présentatrices d'antigènes, cellules dendritiques ...), et d'autre part l'inhibition de l'activité de ces promoteurs au cours du temps par des cytokines inflammatoires comme l'interféron (IFN)  $\gamma$  ou le tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  (Qin *et al.*, 1997, Bromberg *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2003). L'utilisation de promoteurs muscle spécifique, comme les promoteurs de l' $\alpha$ -actine de poulet, de la desmine, ou de la créatine kinase permet en revanche de restreindre l'expression du transgène aux cellules musculaires, limitant ainsi le développement de réponses immunes néfastes contre le produit du transgène (Draghia-Akli *et al.*, 1997, Fabre *et al.*, 2006). Cependant, de tels promoteurs induisent une expression relativement faible, c'est pourquoi Li *et al.*, ont développé des promoteurs muscle-spécifique synthétiques (Li *et al.*, 1999). Dans cette étude, les auteurs ont assemblé de façon aléatoire des éléments de quatre promoteurs muscle-spécifique différents de façon à produire de nouveaux promoteurs synthétiques. Parmi tous les promoteurs synthétisés, le promoteur SP5-12 contenant les boîtes de fixation E-box, MEF-2, TEF-1 et SRE s'est révélé être le plus efficace *in vivo* et est depuis largement utilisé pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique (Tone *et al.*, 2004, Khan *et al.*, 2005, Thacker *et al.*, 2005).

### 4.3. Intégration chromosomique

Après injection dans le muscle squelettique de différentes espèces, le transgène est exprimé pour des durées allant de 4 à 24 mois (*Mumper et Rolland., 1998*). Cette longue durée de l'expression du transgène est attribuée à la persistance du plasmide dans le muscle après injection (*Wolff et al., 1990, Wolff et al., 1991, Wolff et al., 1992*). Plusieurs travaux suggèrent que le plasmide après injection intramusculaire d'ADN nu ou électroporé dans le muscle squelettique reste dans un état épisomal, non-intégré et extra-chromosomal (*Wolff et al., 1990, Acsadi et al., 1991, Wolff et al., 1992*). Wang et al., ont montré que la technique d'électroporation utilisée dans certaines conditions (conditions induisant des dommages tissulaires importants) pouvait augmenter la fréquence d'intégration sans excéder 0,5 % de risque d'intégration (*Wang et al., 2004*). Une étude récente montre que l'utilisation de copolymères à blocs est également relativement sûre (*Vilalta et al., 2005*). La plupart des vecteurs non viraux sont d'ailleurs considérés comme ne permettant pas l'expression du transgène pendant des temps long du fait de l'absence d'intégration chromosomique. Ceci est d'autant plus vrai pour des cellules en division (comme les cellules satellites). C'est pourquoi, il a été développé des plasmides contenant des éléments du virus d'Epstein Barr (EBV) : l'antigène nucléaire 1 (EBVNA1) et l'élément à l'origine de la répllication oriP (*Stoll et al., 2001*). Les protéines EBVNA1 lient l'oriP et facilitent ainsi la répllication du plasmide en synchronisation avec l'ADN chromosomal. Ces protéines facilitent également la localisation nucléaire du plasmide. Le seul inconvénient est que les protéines EBVNA1 peuvent avoir des effets tumorigènes. Le système d'intégration "*Sleeping beauty*" est également employé pour stabiliser l'expression à long terme de gènes codant des protéines sécrétées dans divers tissus chez la souris (revue voir *Hackett et al., 2005*). Ce système ubiquitaire est issu de la classe du transposon *tc1/mariner* et est constitué de 2 éléments : (1) un transposon, lui-même composé du gène d'intérêt flanqué des séquence IRs (inverted repeats) et (2) d'une source de transposase (sous forme de plasmide) qui est capable de reconnaître les extrémités IRs, d'exciser le transposon à partir du plasmide et de l'insérer de façon aléatoire dans le génome de l'hôte.

## 5. Applications du transfert de gènes non viral dans le muscle squelettique.

### 5.1. Expression de protéines intracellulaires pour le traitement de maladies musculaires

#### a. Dystrophie musculaire de Duchenne

C'est dans les années 1860 que la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) a été décrite pour la première fois par le neurologue français, Guillaume Duchenne de Boulogne (*Duchenne, 1861*). En 1879, elle fut définie par Duchenne et Gowers comme une myopathie caractérisée par une dégénérescence musculaire progressive accompagnée d'une pseudohypertrophie musculaire. Dans les années 1950, les développements en génétique ont permis de découvrir que cette maladie récessive était liée au chromosome X (*Walton et Natrass, 1954*). Il a fallu attendre l'avènement de la biologie moléculaire durant les années 1980 pour pouvoir positionner le gène impliqué dans la DMD et identifier la protéine en cause: la dystrophine.

#### La Pathologie

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie caractérisée par des épisodes répétés de nécrose des muscles squelettique et myocardique, conduisant à une dégénérescence progressive ou fibrose des muscles et à une faiblesse musculaire. Elle touche uniquement les garçons. Les filles sont transmettrices et, en général, asymptomatiques. L'incidence de la maladie est d'une naissance sur 3500 garçons en France chaque année. C'est la plus fréquente des myopathies et également la plus grave. Les premiers symptômes apparaissent vers l'âge de 3 ans (chutes fréquentes) et évoluent jusqu'à une perte de la marche autonome vers l'âge de 10 ans. C'est durant cette période que les enfants perdent leur faculté ambulatoire autonome. Ainsi les muscles des membres et du torse perdent de leur masse. Leurs activités se limitent alors à l'emploi des avant-bras et des doigts. La dégénérescence affecte les muscles proximaux, plus que les muscles distaux, ainsi que les muscles des membres inférieurs et dorsaux, plus que les muscles des membres supérieurs. La régression de la force musculaire est constante et presque de manière linéaire entre l'âge de 6 et 11 ans (*Allsop et al. 1981; Cohen et al. 1982*). Les biceps et triceps sont plus affectés que les deltoïdes, les extenseurs du poignet plus que les fléchisseurs et les tibials antérieurs, les péronés plus que les gastrocnémiens, soleus et tibials postérieurs (*Gardner-Medwin 1980*).

L'atteinte cardiaque précoce (cardiomyopathie dilatée) est suivie par une atteinte des muscles respiratoires avec insuffisance respiratoire restrictive vers 15 ans, responsable du décès vers l'âge de 25 ans. Par ailleurs on retrouve chez ces patients, un taux sérique anormalement élevé d'une enzyme, la créatine-kinase (CK), imputable à la dégénérescence des fibres musculaires. Au point de vue histologique, on observe le développement de lésions histopathologiques et ce, dès le début de la myogénèse. Lors de la période néonatale on peut voir des modifications minimales, des fibres hypercontractées qui augmentent progressivement ainsi qu'une augmentation de la CK sérique.

Quelques mois après la naissance, la fibrose endomysiale apparaît, suivie de la nécrose. A partir de l'âge de 10 ans le tissu fibro-graisseux remplace le tissu musculaire.

### **La cause génétique et la protéine dystrophine**

Cette maladie peut être causée par de multiples mutations d'un gène codant une protéine subsarcolemmique de 427 KDa, la dystrophine (*Hoffman et al., 1992*). Celle-ci est soit absente (dystrophie musculaire progressive et sévère de Duchenne), soit présente mais diminuée et/ou altérée qualitativement (dystrophies musculaires moins sévères de type Becker, BMD) (*Hoffman et al., 1988*). En l'absence de dystrophine, les cellules musculaires dégèrent. Bien qu'elles soient régénérées en permanence à partir des cellules satellites, ce phénomène de régénération diminue graduellement dans le muscle dystrophique. Les cycles nécrose-régénération se succèdent jusqu'à ce que les cellules satellites ne puissent plus compenser la destruction continue des fibres musculaires (*Blau et al., 1983*) qui sont alors remplacées par du tissu adipeux et conjonctif à l'origine de la fibrose.

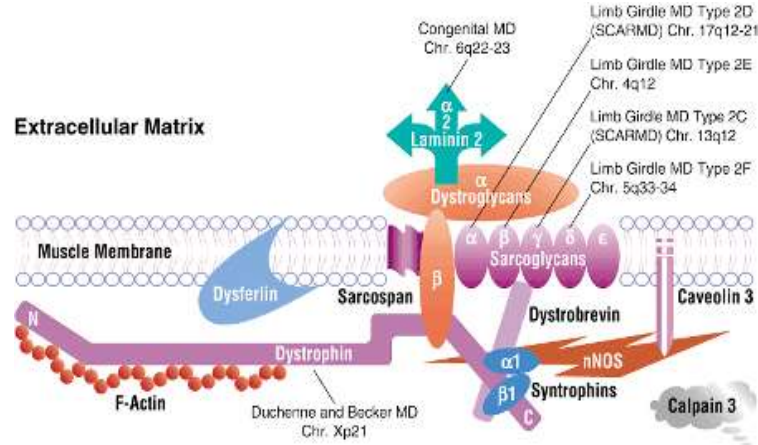
De plus, lorsque la dystrophine est absente, l'équilibre des glycoprotéines associées à la dystrophine faisant partie du DGC (Dystrophin associated Glycoprotein Complex) est également perturbé avec une diminution de l'expression des glycoprotéines (*Ohlendieck et al., 1991*), en particulier les dystroglycanes, les sarcoglycanes et le sarcospan (voir ci-après). Chacune des protéines du complexe a son propre gène, qui peut aussi être altéré par des mutations. Ceci est à l'origine de 13 dystrophies musculaires congénitales connues à l'heure actuelle, ainsi que huit autres maladies neuromusculaires au moins (*Scheuerbrandt et al., 2003*).

Le gène de la dystrophine, localisé sur le bras court du chromosome X, est de grande taille : 2.25 Mb et représente 1% du chromosome X (*Nobile et al., 1997*). Il contient des introns de grande taille et 79 exons, soit un ARN messager de 14 kilo-bases (Kb). Ce gène permet la synthèse de différentes isoformes de la protéine présentes dans divers tissus (muscles striés, lisses, cerveau, foie, rétine, reins) (*Lederfein et al., 1992*).

Deux rôles principaux sont attribués à la dystrophine :

- un rôle mécanique en assurant le lien entre l'actine du cytosquelette et la matrice extracellulaire, conférant ainsi une résistance à la fibre musculaire lors de sa contraction.
- Un rôle dans l'homéostasie du calcium (*Turner et al., 1991*). Des concentrations anormalement élevées de calcium dans la cellule musculaire dystrophique entraîneraient l'activation de protéases responsables de la mort cellulaire des fibres par nécrose.

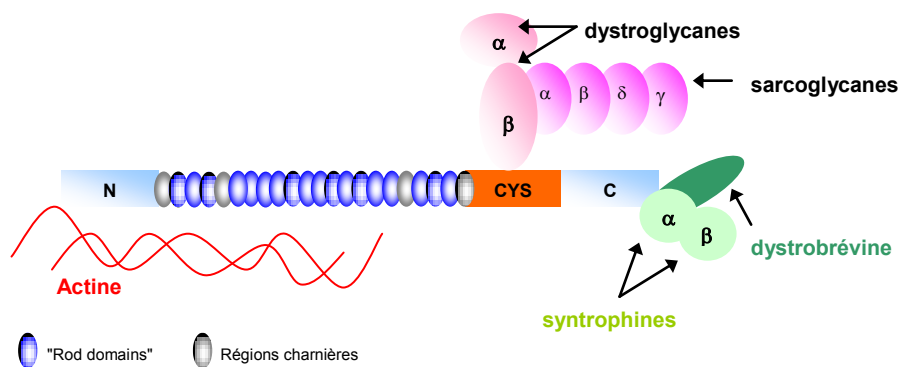
La dystrophine, en effet, est localisée sur la face interne du sarcolemme et assure la liaison entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire via le complexe DGC constitué de plus de 50 protéines, parmi elles les dystroglycanes, les sarcoglycanes, le sarcospan, les syntrophines, la dystrobrevine, et l'oxyde nitrique synthétase (nNOS) (Figure 9).



**Figure 9-Organisation du complexe protéique associé à la dystrophine dans une cellule musculaire striée.**

Plus précisément, la dystrophine est organisée en quatre domaines dont les rôles fonctionnels sont distincts (Figure 10) (Koenig *et al.*, 1988) :

- une région C-terminale de 420 acides aminés qui interagit avec les syntrophines et la dystrobrevine,
- une région riche en cystéine de 240 acides aminés qui interagit avec les complexes sarcoglycane et dystroglycane,
- une région centrale composée de 24 triples hélices de 109 acides aminés, cette région est aussi appelée "rod domain" et est associée à des régions charnières,
- une région N-terminale de 240 acides aminés qui constitue le site de fixation des filaments d'actine du cytosquelette.



**Figure 10-Représentation schématique de la structure de la dystrophine et des protéines associées.**  
*N* : domaine N-terminal, *CYS* : région riche en cystéine, *C* : domaine C-terminal.

La dystrophine, avec sa structure modulaire, et notamment son domaine central est une protéine tolérant l'ablation de certaines régions internes, pourvu que la phase de la séquence codante finale soit préservée. Cela a conduit au concept de modèles réduits mais encore fonctionnels de la dystrophine, les mini-dystrophine et micro-dystrophine, très utilisées dans les essais de thérapie génique par transfert de gènes (voir ci-après).



Les différents types de mutation du gène de la dystrophine sont à l'origine de la maladie avec des conséquences plus ou moins graves et invalidantes. Cette hétérogénéité clinique est sous-tendue par une hétérogénéité des mutations dans le gène codant la dystrophine, qui de part sa taille, est l'objet de mutations très variables que l'on peut regrouper en deux catégories affectant différemment la synthèse de la dystrophine : (1) les grands remaniements touchant un ou plusieurs exons (délétions dans 60 %-70 % des cas, duplications dans 10 %-15 % des cas) ; (2) les « petites » mutations intra-ou juxta-exoniques (mini-insertions ou délétions, mutations ponctuelles de type non-sens direct, mutations d'épissage).

En ce qui concerne les grandes délétions internes, de loin les plus fréquentes, la sévérité du phénotype (Duchenne ou Becker) n'est pas conditionnée par leur étendue mais par l'impact sur le cadre de lecture. De très grandes délétions entraînent un tableau clinique peu sévère si le cadre de lecture est préservé. En effet, si le nombre de nucléotides ajoutés ou délétés est divisible par trois, le cadre de lecture de l'ARN messager reste inchangé. La dystrophine produite est alors plus longue ou plus courte, et selon la partie de la protéine concernée, elle pourra garder une partie de ses fonctionnalités.

En règle générale, la forme de Duchenne est due à des mutations nulles (mutations interrompant le cadre de lecture, comme les mutations non-sens direct, les délétions ou insertions créant un codon non-sens prématuré). Ce type mutation ponctuelle peut en effet créer un codon stop au sein du gène si bien que la protéine produite sera tronquée et non fonctionnelle. Au cours de cette pathologie, quelques rares cellules dites révertantes, synthétisent tout de même la dystrophine. L'expression d'une dystrophine tronquée mais fonctionnelle dans ces quelques fibres serait la conséquence de mécanismes de saut d'exons massif (Lu et al., 2000).

## **b. Modèles animaux de la myopathie de Duchenne**

Trois principaux modèles animaux de dystrophie musculaire sont utilisés pour la compréhension des mécanismes impliqués et les essais thérapeutiques de la DMD : la souris *mdx* (X linked Muscular Dystrophy), le chat HFMD (hypertrophic feline muscular dystrophy) et le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy).

La souris *mdx* présente un défaut génétique tout à fait similaire à celui trouvé chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne.

La souris *mdx* possède une mutation (transversion d'un nucléotide C pour un T) à la position 3185, ce qui converti le codon glutamine CAA en un codon d'arrêt TAA (Sicinski et al. 1989). Cette mutation spontanée s'est produite chez la souche de souris congénitale C57bl/10ScSn. Le produit du gène muté de la dystrophine est tronqué et ne possède pas la capacité fonctionnelle de s'attacher au sarcolemme. De plus, comme chez les patients DMD, il en résulte une absence marquée du complexe glycoprotéique DGC associé à la dystrophine (Ohlendieck et al. 1991).

Ces souris ont un phénotype normal jusqu'à deux semaines, âge auquel débutent des cycles de dégénérescence et régénérescence qui se poursuivent de manière intense jusqu'à 12 semaines. L'espérance de vie de ces souris est normale. Ce modèle est imparfait puisque ce n'est que tardivement que s'installe, au niveau de la musculature striée squelettique, une fibrose avec un déficit musculaire lors d'efforts concentriques. En effet, les souris *mdx*, comparées aux humains, ne présentent que peu de phénotypes associés à la maladie. On observe peu de fibres musculaires en nécrose qui sont continuellement remplacées par des fibres régénératrices au lieu du tissu conjonctif. Toutes les fibres musculaires des souris *mdx* ont leurs noyaux localisés au centre de la fibre, même lorsque celles-ci ont atteint leur maturité. Les fibres de type II sont préférentiellement remplacées par des fibres de type I, comme chez les patients DMD (Jackson et al. 1984). Les causes menant à un phénotype adouci, malgré l'absence de dystrophine chez la souris *mdx*, ne sont pas encore comprises. Les explications possibles englobent plusieurs hypothèses :

-une régénérescence intensive des fibres musculaires par fusion des cellules satellites avec un potentiel régénératif élevé compenserait en grande partie les phénomènes de nécrose, contrairement à la pathologie humaine (Blake et al., 2002, Grounds et al. 1991) ;

-une suppression de la protéolyse calcium dépendante pourrait être impliquée chez ces souris (DiMario et al. 1989);

-les fibres musculaires des souris ne subiraient pas des stress mécaniques aussi imposants que chez les humains et les chiens.

Néanmoins, des études histologiques et fonctionnelles de ces muscles permettent cependant d'évaluer le bénéfice de l'expression de la dystrophine (Petrof et al., 1993, Bartoli et al., 2006).

Une autre souche de souris *mdx* a été produite par mutagenèse chimique pour inactiver le gène de la dystrophine. La souris *mdx*<sup>3Cv</sup> n'exprime pas les isoformes de 427 kDa et de 70 kDa de la dystrophine. La différence entre la *mdx*<sup>3Cv</sup> et la *mdx* est que très peu de nouveau-nés par portée de *mdx*<sup>3Cv</sup> survivent. Le développement de la maladie s'effectue de la même manière que chez la souris *mdx* (Cox et al. 1993).

Les **chats HFMD** représente un modèle animal spontané apparenté à la DMD (Carpenter et al., 1989). Les dystrophies chez les chats sont plus rares et les symptômes sont observés durant leur première ou leur deuxième année de vie. Les chats malades présentent un élargissement musculaire, une langue proéminente, une mobilité affectée et des signes de cardiomyopathie. Sur des coupes de muscles, on observe des amas de fibres musculaires nécrotiques et un faible marquage pour la dystrophine (Gaschen et al. 1992). Le site de mutation n'a pas été identifié à ce jour.

Les **chiens GRMD** développent également une dystrophie musculaire progressive secondaire à l'absence de dystrophine, conduisant au décès précoce des animaux (Cooper et al., 1988).

L'absence de dystrophine chez les chiens cause une myopathie et cardiomyopathie similaire aux patients DMD (Valentine et al. 1992). La mutation est causée par le changement d'une base A par G à l'intérieur d'un site d'épissage consensus situé à l'extrémité 3' de l'intron 6, ce qui résulte en une

protéine déficiente des exons 6 à 8. On observe des taux de créatine kinase élevés qui sont augmentés par l'exercice. Les chiens dystrophiques ont une stature raide avançant à petits pas, une démarche chambranlante, une difficulté à ouvrir la mâchoire et à se nourrir. Ils salivent aussi excessivement à cause de l'épaississement de la base de leur langue. Au niveau histologique, les fibres nécrosées sont graduellement remplacées par du tissu fibreux causant une atrophie.

Certaines études de mécanismes de la maladie sont réalisés chez les **invertébrés** (revue *Scheuerbrandt et al., 2004*). Le ver nématode *Caenorhabditis elegans* est particulièrement intéressant, par sa facilité d'élevage et l'obtention facile de nombreux mutants. Plus récemment un modèle a été obtenu chez la drosophile. Le poisson zèbre possédant une mutation particulière présente une différenciation musculaire normale suivi d'une dégénérescence musculaire évoquant une dystrophie type Duchenne. Cette mutation touche le gène orthologue du gène DMD.

### **c. Approches thérapeutiques et thérapie génique de la myopathie de Duchenne.**

En général, les stratégies thérapeutiques de la myopathie de Duchenne, sont classées en trois groupes distincts :

- les traitements pharmacologiques conventionnels,
- la thérapie cellulaire à l'aide de myoblastes ou de cellules souches,
- la **thérapie génique** incluant les approches basées sur le transfert de plasmides ou d'oligonucléotides.

Notre équipe s'est intéressée à une stratégie qui consiste en l'introduction d'acides nucléiques dans les cellules musculaires à l'aide de nouveaux nanovecteurs synthétiques. Après avoir énuméré les différents types de traitements envisagés en clinique, nous nous attacherons donc plus particulièrement à discuter des différentes techniques du transfert d'acides nucléiques à l'aide de procédés non viraux dans le muscle squelettique pathologique.

#### **i. Thérapie pharmacologique**

La thérapie pharmacologique vise généralement à diminuer les symptômes de la dystrophie plutôt qu'à en traiter la cause génétique. Différentes substances ont été testées chez des patients, comme les glucocorticoïdes (prednisone<sup>®</sup>, prednisolone<sup>®</sup>, deflazacort<sup>®</sup>), la créatine, l'oxandrolone<sup>®</sup> (stéroïde anabolisant), les régulateurs de l'homéostasie calcique, et les molécules permettant la sur-expression de l'utrophine (protéine compensatrice de la dystrophine). Dans une étude publiée récemment, l'administration du deflazacort<sup>®</sup> en complément de la L-arginine chez des souris *mdx* permet une amélioration considérable et persistante de capacités régénératrices et des propriétés contractiles des muscles (*Archer et al., 2006*). La combinaison de ces différentes approches serait d'avantage bénéfique mais les probabilités d'interaction et d'effets secondaires sont trop importantes

pour envisager un développement clinique sûr (revue voir *Scheuerbrandt et al., 2004, Khurana et Davies., 2003*).

Des résultats encourageants ont été obtenus chez la souris *mdx* traitée par un inhibiteur du protéasome, le MG-132. Cette molécule permet en effet la ré-association du complexe DGC à la membrane sarcoplasmique (*Bonuccelli et al., 2003*). L'inhibiteur de protéase " BBIC " (*Bowman-Birk Inhibitor*) testé dans le laboratoire de L. Sweeney (USA) sur les souris *mdx* améliorerait la stabilité de la cellule musculaire et n'aurait pas d'effets secondaires. Un essai clinique de phase I est planifié avec le NIH (Kenneth Fischbeck-*National Institute of Health-USA*). L'inhibiteur de protéase " MYODUR " est un inhibiteur des calpaïnes, qui sont sur-activées en absence de dystrophine, conduisant à une dégradation excessive de protéines. Un essai de phase I est prévu par la société de biotechnologie Ceptor Corporation (T. Michele -USA).

La myostatine est un inhibiteur endogène de la croissance musculaire. Le blocage par anticorps ou par peptide bloqueur de la myostatine atténue la dystrophie musculaire chez la souris *mdx* (*Bogdanovich et al., 2002, Bogdanovich et Perkins., 2004, Bogdanovich et al., 2005*). Des essais cliniques chez l'homme utilisant des anticorps bloquants dirigés contre la myostatine ont débuté (laboratoire pharmaceutique Wyeth, USA) .

Une stratégie différente a été testée chez l'homme avec la gentamycine, un antibiotique de type aminoglycoside. Cet antibiotique permet, lors de la traduction de l'ARN messenger, d'ignorer les codons stop prématurés mais pas les codons stops normaux qui se trouvent dans un environnement tridimensionnel particulier. Cet antibiotique a donné des résultats mitigés chez la souris *mdx* (*Barton-Davis et al., 1999, Dunant et al., 2003*) et aucun résultat probant chez l'homme (*Wagner et al., 2001*).

## ii. Thérapie cellulaire

### • Transplantation de myoblastes

L'injection de myoblastes dans les muscles de patients DMD ou des souris *mdx*, comme thérapie pour la dystrophie musculaire, est basée sur la capacité de ces cellules à fusionner avec les fibres musculaires de l'hôte, transférant ainsi leur noyau contenant le gène normal de la dystrophine. La dystrophine et ses protéines associées sont alors exprimées au niveau du sarcolemme des fibres malades (*Partridge et al. 1989*). Par contre, la transplantation de myoblastes ne s'effectue pas sans obstacles :

Cette technique a été utilisée avec succès chez la souris *mdx* mais les essais cliniques réalisés chez des patients DMD n'ont pas été aussi bénéfiques (*Gussoni et al. 1992; Huard et al. 1992; Karpati et al. 1993; Tremblay et al. 1993; Mendell et al. 1995*), bien que l'administration concomitante d'immunosuppresseur améliore la survie des myoblastes transplantés (*Mouly et al., 2005, Lee-Pullen et Grounds.,2005, Vilquin., 2005*). Le rejet spécifique par le système immunitaire des myoblastes transplantés doit être contrôlé par des immunosuppresseurs. Chez la souris, entre 70-80% des

myoblastes injectés meurent dans les 72 premières heures après la greffe (Merly *et al.* 1998) ce qui nécessite l'injection d'une grande quantité de cellules (Beauchamp *et al.* 1999). Et la faible migration des myoblastes à l'intérieur du muscle nécessite des injections multiples avec des trajectoires très rapprochées.

#### • Transplantation de cellules souches

L'utilisation de cellules de la moelle osseuse pour former du tissu musculaire a récemment soulevé un grand intérêt (Bittner *et al.*, 1999, Corbel *et al.*, 2003, Camargo *et al.*, 2003). En effet, les cellules de la moelle osseuse semblent participer à la formation de fibres musculaires normales, en migrant de la circulation sanguine aux sites de régénération (Ferrari *et al.* 1998; Gussoni *et al.* 1999). De plus, l'injection de cellules de la moelle osseuse directement dans le muscle de souris a permis la production de fibres musculaires, à un taux plus faible cependant que l'injection de cellules d'origine musculaire (Ferrari *et al.* 1998). La faible efficacité de ces protocoles thérapeutiques limite leur développement clinique (Cossu et Mavilio., 2000, Gussoni *et al.*, 2002). Le faible taux de migration des cellules de la moelle osseuse aux muscles ne permet pas d'envisager cette application comme traitement des dystrophies musculaires. En effet, le groupe de Weinberg a récemment rapporté le cas d'un enfant ayant reçu une transplantation de moelle osseuse pour une déficience immunitaire sévère et qui a été diagnostiqué DMD à l'âge de 12 ans. L'analyse des muscles a révélé la présence de noyaux provenant du donneur de la greffe de moelle osseuse, mais un très faible pourcentage (0,5 – 0,9 %) de fibres dystrophine positives étaient présentes (Gussoni *et al.* 2002).

Des cellules souches multipotentes issues de plusieurs autres tissus sains comme le muscle squelettique (Gussoni *et al.*, 1999, Huard *et al.*, 2003, Payne *et al.*, 2005, Bachrach *et al.*, 2006), l'endothélium (Le Grand *et al.*, 2004), le tissu adipeux (Rodriguez *et al.*, 2005), ou encore le tissu nerveux, ont récemment été utilisées pour permettre l'expression de la dystrophine dans les muscles squelettique et cardiaque dystrophiques.

### iii. Thérapie génique

La thérapie génique a pour objectifs :

- de **réparer** le produit du gène défectueux, on parle de thérapie génique correctrice
- ou d'**ajouter** dans les cellules le gène sain correspondant, thérapie que l'on qualifie de thérapie génique additive.

#### • Thérapie génique correctrice

Dans environ 65% des cas de DMD, les mutations de type insertion/délétion induisent un décalage du cadre de lecture et 35% des garçons atteints ont soit des mutations non-sens ou des mutations qui affectent les sites d'épissage (*Kapsa et al., 2001*). Basées sur les différents types de mutations impliquées dans la DMD, plusieurs stratégies de correction du gène de la dystrophine ont été envisagées.

Récemment, plusieurs groupes ont développé une stratégie qui consiste à induire le changement d'une seule paire de bases au sein de l'ADN génomique. Ceci est rendu possible par l'utilisation d'oligonucléotides chimères ARN/ADN ("**chiméraplastes**") complémentaires à la séquence cible excepté pour une seule base restant alors non appariée. Lorsque la séquence du chimère s'aligne avec l'ADN génomique complémentaire, la base non appariée est reconnue par la machinerie de réparation de l'ADN qui corrige alors la base du gène cible. L'injection intramusculaire, chez la souris *mdx* et le chien *GRMD*, de chiméraplastes dirigés contre le point de mutation du gène de la dystrophine permet une expression de la dystrophine localisée autour du site d'injection (*Rando et al., 2000, Bartlett et al., 2000*). Le taux maximal d'expression de la dystrophine au niveau du tibia antérieur est de 1 à 2% (niveau protéique) deux semaines après injection chez la souris et est de 10 % (niveau transcrit ARNm) chez le chien, ce qui suppose un phénomène de correction relativement rare.

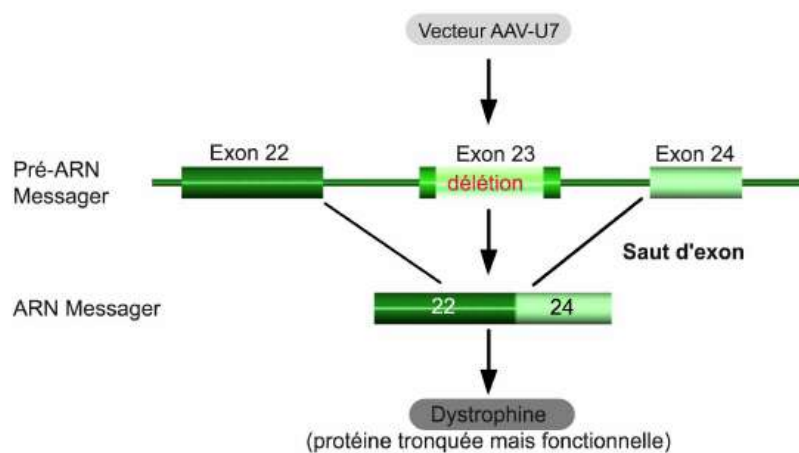
Une seconde méthode nommée **ssSFHR** ("single-stranded short-fragment homologous replacement") est utilisée pour corriger une mutation par recombinaison homologue. Elle consiste en l'introduction de courts fragments d'ADN (amplicons) normaux dans le noyau de cellules mutées. Cette technique peut être utilisée à la fois pour restaurer un cadre de lecture normal par insertion ou délétion d'un simple nucléotide ou d'une séquence nucléotidique plus étendue (*Wong et al., 2005*). Les travaux de Kapsa et al., ont montré la faisabilité de cette technique dans le muscle squelettique de souris *mdx* chez lesquelles les auteurs ont injecté un produit de PCR sauvage capable de corriger le défaut génétique (*Kapsa et al., 2001*). Cependant, la fréquence de réparation reste faible (de 0.00001 à 0.1%).

Plusieurs études suggèrent que le phénomène de correction génique induit par les chiméraplastes ou les amplicons serait efficace préférentiellement dans les cellules prolifératives et non dans les fibres post-mitotiques matures (*Kapsa et al., 2001, Bertoni et Rando., 2002, Wong et al., 2005*).

Depuis ces cinq dernières années, une autre stratégie pour le traitement de la myopathie de Duchenne est envisagée. Plusieurs équipes ont montré que l'administration intramusculaire (IM) ou intraveineuse (IV) de courtes séquences d'**oligonucléotides anti-sens** dirigés contre le site donneur d'épissage 5' de l'intron précédant l'exon portant la mutation (intron 22 pour la souris *mdx*, intron 6 pour le chien GRMD), peuvent induire le saut de l'exon, rétablir le cadre de lecture et permettre ainsi l'expression d'une protéine tronquée mais fonctionnelle (Mann *et al.*, 2001, GebSKI *et al.*, 2003, Alter *et al.*, 2006, McClorey *et al.*, 2006, Fletcher *et al.*, 2006).

La majorité des patients présentent de large délétions dans le gène de la dystrophine mais environ 40 % des patients DMD et BMD seraient éligibles pour cette stratégie de saut d'exon. Il s'agit néanmoins d'une thérapeutique à la carte, c'est à dire spécifique d'un allèle. Une étude récente relate cependant la possibilité de combiner plusieurs oligonucléotides permettant ainsi de viser plusieurs exons (saut des exons 19 à 25) du gène de la dystrophine (Fall *et al.*, 2006).

Même si la plupart des études menées ont montré une expression de la dystrophine allant jusqu'à 5 semaines après injection, la durée de vie des oligonucléotides *in vivo* nécessite de réaliser autant d'injections que nécessaire. Pour limiter cela, une expression persistante de la protéine a été obtenue chez la souris *mdx* après injection par voie vasculaire d'AAVs exprimant des séquences antisens liées à des petits ARN nucléaires (Figure 11) (Goyenvalle *et al.*, 2004, Denti *et al.*, 2006).



**Figure 11- Représentation schématique de la technique du saut d'exon.**

L'administration intramusculaire (IM) ou intraveineuse (IV) d'un vecteur AAV codant l'oligonucléotide anti-sens dirigé contre le site donneur d'épissage 5' de l'intron précédant l'exon portant la mutation (intron 22 pour la souris *mdx*) et couplé à l'ARN nucléaire U7, induit le saut de l'exon 23, rétablit le cadre de lecture et permet ainsi l'expression de la dystrophine tronquée mais fonctionnelle dans le muscle squelettique. (Source AFM).

Une étude récente basée sur l'analyse de transcriptome musculaire montre que l'injection de séquences antisens chez la souris *mdx* permet de restaurer partiellement ou complètement, selon le niveau de transfection, le profil d'expression des gènes (t'Hoën *et al.*, 2006). De façon intéressante, cette étude montre que l'injection IM d'oligonucléotides antisens en présence d'un copolymère à blocs, le poloxamère 407 formulé dans un milieu salin est moins efficace que le vecteur viral AAV-U7

pour permettre l'expression de la dystrophine mais possède l'avantage de ne présenter aucune réponse inflammatoire au sein du tissu musculaire contrairement au PEI, qui induit une réponse inflammatoire plus que néfaste chez les souris *mdx*. Cette technique d'analyse du transcriptome représente en elle-même une avancée intéressante pour l'étude de l'impact au niveau moléculaire du transfert de gènes ou d'oligonucléotides chez la souris *mdx*.

#### • Thérapie génique additive

Compte tenu de la grande taille du gène codant la dystrophine (2,4 Mb, 79 exons) et des vecteurs utilisés fréquemment qui ne peuvent pas contenir des séquences plasmidiques aussi grandes, des gènes codant des protéines plus courtes ont été mis au point. Ces gènes codent des protéines nommées micro- ou mini-dystrophines, ces dernières conservent les régions d'interaction avec les protéines du DGC, mais la partie centrale ("rod domains") est très réduite. Il a été démontré que la micro-dystrophine (amputée de 60 % de la séquence peptidique) doit contenir au moins 4 domaines rod centraux et 3 régions charnières, en plus des régions indispensables d'interaction protéiques, pour restaurer le complexe DGC à la membrane des fibres (*Sakamoto et al., 2002*). Les domaines conservés de la micro-dystrophine ne sont pas suffisants pour entraîner la relocalisation de la nNOS qui est impliquée dans l'amélioration significative du phénotype dystrophique (*Wehling et al., 2001*). En revanche, les gènes de la dystrophine (14 kb) et de la mini-dystrophine (amputée de 46 % de la séquence peptidique) (6.3 kb) sont non seulement capables de restaurer les complexes DGC, mais sont aussi capables de relocaliser la nNOS à la membrane (*Decrouy et al., 1998*). L'expression d'une micro-ou mini-dystrophine permet également la transition d'un phénotype "dystrophie de Duchenne" à un phénotype "dystrophie de Becker".

La technique d'injection d'ADN nu dans le muscle squelettique a été la première utilisée pour le transfert de gène de la dystrophine chez la souris *mdx* et chez le chien *GRMD* (*Acsadi et al., 1991, Braun., 2004*). Un essai clinique de phase I démontrant l'innocuité et la tolérance de l'injection d'un plasmide codant la dystrophine humaine chez des patients atteints de la myopathie de Duchenne a été réalisé à l'Institut de Myologie (*Romero et al., 2004*). Les résultats montrent cependant une faible expression de la dystrophine chez 6 patients sur 9. Aucune réaction immunitaire contre le plasmide ou contre la dystrophine nouvellement exprimée n'a été détectée. La tolérance clinique à l'administration du plasmide a donc été excellente mais pour être suffisamment efficace, le transfert d'ADN plasmidique doit être optimisé. Pour améliorer cette efficacité de transfection, l'administration du plasmide par voie intravasculaire est également réalisée avec succès chez la souris *mdx* (*Zhang et al., 2004a*). L'administration d'un plasmide codant la dystrophine entière par voie intraveineuse locorégionale est envisagée pour un essai clinique de phase I chez des patients DMD (Investigateur Transgène, source AFM). Enfin, l'administration de l'ADN par voie intraveineuse avec pression



hydrodynamique chez la souris *mdx* permet de transférer un muscle respiratoire affecté dans cette pathologie, le diaphragme (*Liu et al., 2001*).

La technique d'**électrotransfert** a été appliquée avec un certain succès afin de faire exprimer la dystrophine dans le muscle squelettique de souris *mdx* (*Vilquin et al., 2001, Gollins et al., 2003*). Cependant cette technique induit un traumatisme musculaire, rendant difficile son application clinique. L'exposition aux **ultrasons** du muscle injecté avec un plasmide codant la dystrophine est une méthode moins invasive qui améliore la transfection chez la souris saine (*Taniyama et al., 2002*). Cette technique a été testée également chez la souris *mdx* pour évaluer l'efficacité de transfection dans ce modèle pathologique en utilisant un gène marqueur (*Danielou et al., 2002*) mais aucune publication ne présente encore de résultats concernant l'expression de la dystrophine.

**Dans ce contexte de thérapie génique additive, le chapitre 1 de ma thèse consiste à évaluer l'efficacité du transfert du gène de la mini-dystrophine à l'aide de copolymères à blocs dans le muscle squelettique de souris *mdx*.**

## **5.2.Sécrétion ectopique de protéines après transfert de gènes dans le muscle squelettique**

L'utilisation de micro-organismes pour la production de protéines thérapeutiques à haute valeur ajoutée (hormones, vaccins, facteurs de coagulation...) a été l'une des premières applications envisagées pour le génie génétique. Elle permet de s'affranchir des problèmes liés à la difficulté de purifier ces protéines à partir de leurs producteurs naturels (fluides biologiques humains), de s'assurer de l'absence de contaminants redoutés (virus, prions entre autres) et, pour un industriel, de maîtriser totalement la chaîne de production. Le génie génétique permet, en principe, de faire synthétiser n'importe quelle protéine à partir d'un gène isolé transféré dans une cellule qui prend en charge son décodage et le plus souvent la sécrétion de la protéine en question. Une protéine ainsi obtenue en dehors de sa cellule d'origine est dite recombinante.

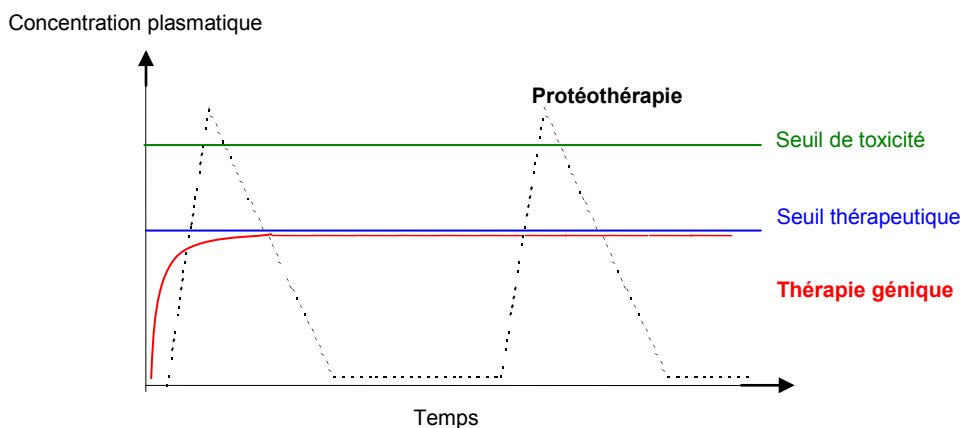
Les bactéries, facilement transformables par des gènes étrangers et cultivées depuis longtemps à l'échelle industrielle, ont été les premières cellules sollicitées pour produire des protéines recombinantes.

Les levures et les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) sont de même utilisés industriellement. C'est ainsi que désormais la majeure partie de l'insuline utilisée pour soigner le diabète provient de cellules recombinantes, et non plus de pancréas de porc. Il en est de même pour l'hormone de croissance humaine utilisée pour soigner certaines formes de nanisme, et l'hormone de croissance bovine, utilisée pour augmenter la sécrétion lactée des ruminants.

Ces molécules ont une excellente activité biologique et elles sont plus pures que les hormones obtenues par extraction de fluides biologiques. C'est notamment le cas de l'hormone de croissance humaine extraite d'hypophyses humaines qui a, dans certains cas, contaminé les patients par l'agent responsable de la maladie de Creutzfeld-Jacob. La culture des cellules animales est une réalité industrielle bien établie. Elle permet actuellement la production de protéines comme l'antigène vaccinant contre le virus de l'hépatite B, l'érythropoïétine ou le facteur VIII de coagulation.

Mais ce mode de production reste coûteux et nécessite dans la plupart du temps l'utilisation de nombreux procédés pour extraire la protéine du milieu de culture, et l'utilisation d'agents stabilisants pour la conservation. De plus, la demi-vie des protéines produites s'avère plus ou moins courte et nécessite toujours des administrations très fréquentes (quotidiennes à hebdomadaires) chez le patient.

Depuis maintenant une dizaine d'année, la thérapie génique se révèle être une alternative particulièrement intéressante. En effet, une stratégie séduisante consiste à apporter le gène normal dans les propres cellules du malade devenues de véritables bio-réacteurs pour produire et sécréter la protéine recombinante dans la circulation générale. L'avantage dans ce cas est une meilleure pharmacocinétique parce que la protéine serait sécrétée de façon stable évitant ainsi ce schéma d'injections répétées (Figure 12).



**Figure 12-Principe théorique de la sécrétion ectopique de protéines : avantage pharmacocinétique de la thérapie génique.**

*La thérapie génique tendrait à obtenir une concentration plasmatique de protéines proche du seuil thérapeutique sans pour autant atteindre le seuil de toxicité. Et contrairement à la protéothérapie, la thérapie génique permet un effet thérapeutique stable de la protéine d'intérêt.*

Le muscle squelettique est un organe richement vascularisé et peut par la même être utilisé en tant que tissu endocrine artificiel (partie 2 de l'Introduction).

De nombreuses études ont montré le potentiel des vecteurs non viraux pour la sécrétion de protéines d'intérêt thérapeutique visant des niveaux thérapeutiques dans la circulation après transfert de gène dans le muscle squelettique (Tableau 3).

#### a. Sécrétion locale de protéines

Les premiers résultats thérapeutiques ont été obtenus par injection d'ADN nu pour soigner la gangrène des extrémités, consécutive à une ischémie musculaire. Le plasmide codant un facteur de vascularisation, le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est injecté, par voie intramusculaire, à proximité de l'affection gangreneuse. Cet ADN transfecte une petite quantité de cellules musculaires qui vont ainsi exprimer et sécréter le VEGF. Ce facteur vascularisant diffuse et induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, entraînant ainsi la guérison de la zone nécrosée (*Baumgartner et al., 1998*). Il a ainsi été possible de revitaliser des mains et des pieds qui auraient dû être amputés. Un essai clinique de phase I vient de débiter pour le traitement d'ischémie périphérique des membres par injection intramusculaire d'un gène codant un facteur pro-angiogénique Del-1 formulé avec un copolymère à blocs, le Pluronic F68 ou Lutrol (Investigateur : Hinohara, Valentis, Inc.). Certaines expériences relatent également l'administration intramusculaire de gènes codant l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) ou le FGF (Fibroblast Growth Factor) pour le traitement de pathologies ischémiques périphériques.

Pathologie	Protéine	Vecteur	Espèce	Références
<b>Pathologies ischémiques-angiopathies</b>	VEGF	ADN nu	lapin, homme	<i>Tsurumi et al., 1996, Takeshita et al., 1996a, 1996b, Baumgartner et al., 1998, Simovic et al., 2001, Shyu et al., 2003</i>
		électroporation ultrasons	souris rat, lapin	<i>Abruzzese et al., 2000, Jang et al., 2004, Zhang et al., 2006, Schratzberger et al., 2002</i>
	Del-1	polymère	souris, lapin, homme	<i>Quezada et al., 2004</i>
	HGF	ADN nu	homme	<i>Morishita et al., 2004</i>
		électroporation	souris, rat, hamster	<i>Xue et al., 2002, 2003, Umeda et al., 2004, Komamura et al., 2004, Tanaka et al. 2002, Mizui et al., 2004</i>
	FGF	polymère	rat	<i>Riera et al., 2004, Cruzado et al., 2004, Franquesa et al., 2005</i>
ultrasons		lapin	<i>Taniyama et al., 2002</i>	
ADN nu		hamster, homme	<i>Comerota et al., 2002, Caron et al., 2004</i>	
<b>Diabète</b>	insuline	électroporation	souris, rat	<i>Mir et al., 1999, Nishikage et al., 2004</i>
		ADN nu	souris, rat	<i>Abai et al., 1999, Kon et al., 1999, Hartikka et al., 2000, Shaw et al., 2002, Yin et al., 2001, Martinenghi et al., 2002, Croze et Prud'Homme 2003, Wang et al., 2003, Wilson et al., 2005</i>
<b>Anémies, insuffisance rénale, cancers</b>	$\beta$ -thalassémies, érythropoïétine	ADN nu	souris, rat	<i>Tripathy et al., 1996, Hagstrom et al., 2004</i>
		électroporation	souris, rat, lapin, macaque	<i>Rizzuto et al., 1999, Rizzuto et al., 2000, Maruyama et al., 2000, Vincent et al., 2000, Terada et al., 2001, Terada et al., 2002, Mennuni et al., 2002, Nicol et al., 2002, Ataka et al., 2003, Lamartina et al., 2003, Nordstrom et al., 2003, Fattori et al., 2005, Lemieux et al., 2000</i>
		polymère	souris	<i>Lemieux et al., 2000</i>
<b>Déficit en hormones de croissance (axe GH-GHRH-IGF-1)</b>	GH-GHRH-IGF-1	ADN nu	cochon, chèvre	<i>Everett et al., 2000, Meng et al., 2004</i>
		électroporation	souris, rat, chat, chien, cochon, vache	<i>Alila et al., 1997, Anwer et al., 1998, Draghia-Akli et al., 1999, Shiotani et al., 1999, Draghia-Akli et al., 2002a, 2002b, Khan et al., 2003, Rabinovsky et Draghia-Akli, 2003, Draghia-Akli et al., 2003a, Draghia-Akli et al., 2003b, Takahashi 2003, Brown et al., 2004, Draghia-Akli et Fiorotto 2004, Tone et al., 2004, Khan et al. 2005a, Khan et al. 2005b Schertzer et al., 2006, Schakman et al., 2006, Thacker et al., 2006.</i>
<b>Déficit en <math>\alpha</math>1antitrypsine (<math>\alpha</math>1AT)</b>	$\alpha$ 1AT	ADN nu	souris	<i>Bou-Gharios et al., 1999, Levy et al., 1999</i>
<b>Hémophilies A et B</b>	FVIII, FIX	électroporation	souris, chien	<i>Bettan et al., 2000, Fewell et al., 2001, Long et al., 2005</i>

**Tableau 3-Pathologies cibles pour le transfert de gènes non viral codant des protéines sécrétées dans le muscle squelettique de différentes espèces animales.**

### **i. Les pathologies ciblées**

Le muscle squelettique est également un excellent candidat en tant que tissu néo-endocrine pour l'expression et la sécrétion de protéines à action systémique comme les facteurs de coagulation, les facteurs de croissance (Tableau 3) ou encore les cytokines (*pour revue, voir Piccirillo et Prud'Homme 2003*).

-Des études réalisées chez des modèles murins sains ou hémophiles de type A et B (*Lynch et al., 1999*) ont montré la possibilité de faire sécréter par le muscle les facteurs de coagulation VIII et IX. Malheureusement, la quantité de protéines produite n'est pas suffisante pour obtenir un effet thérapeutique (*Wells 2006*). L'administration du transgène par voie vasculaire serait probablement plus efficace.

- Depuis une dizaine d'années, sont réalisés de nombreux travaux avec les gènes codant des protéines de l'axe de l'hormone de croissance, GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone)-GH (Growth Hormone)-IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), chez le petit et le gros animal comme le porc. Ils ont permis d'entamer un essai clinique de phase I chez l'homme par injection intramusculaire d'ADN nu (Investigateur : Popat U, source Journal of Gene Medicine).

-Les gènes de l'insuline et de ses précurseurs peptidiques sont étudiés avec grand intérêt pour le traitement du diabète. Un essai clinique utilisant le gène de la pro-insuline est en cours de révision (Investigateur : Gotellieb, Bayhill Therapeutics, source Journal of Gene Medicine).

-Les maladies auto-immunes et inflammatoires, ou les cancers font aussi l'objet de nombreuses recherches. En effet, il a été démontré que le muscle squelettique était capable de sécréter dans la circulation générale des interférons, des cytokines anti-inflammatoire (TGF- $\beta$ ) ou des inhibiteurs de cytokines pro-inflammatoires (*Raz et al., 1993, Piccirillo et Prud'Homme 2003*).

-Le déficit en  $\alpha$ 1antitrypsine ( $\alpha$ -1AT) est la seconde maladie génétique pulmonaire après la mucoviscidose pour pourrait bénéficier du transfert de gènes non viral dans le muscle squelettique.

- Enfin, l'érythropoïétine (EPO) est une hormone très utilisée aujourd'hui en clinique sous forme de protéine recombinante pour le traitement d'anémies induites par diverses pathologies telles que la  $\beta$ -thalassémie, les cancers ou encore l'insuffisance rénale chronique. Le transfert du gène de l'EPO est aujourd'hui très largement étudié afin de suppléer son déficit dans de nombreux contextes pathologiques.

***Un des projets de ma thèse consiste à étudier le potentiel des copolymères à blocs pour le transfert du gène codant l'EPO dans le muscle squelettique afin de traiter l'anémie consécutive à l'insuffisance rénale chronique.***

## *Anémie et insuffisance rénale chronique*

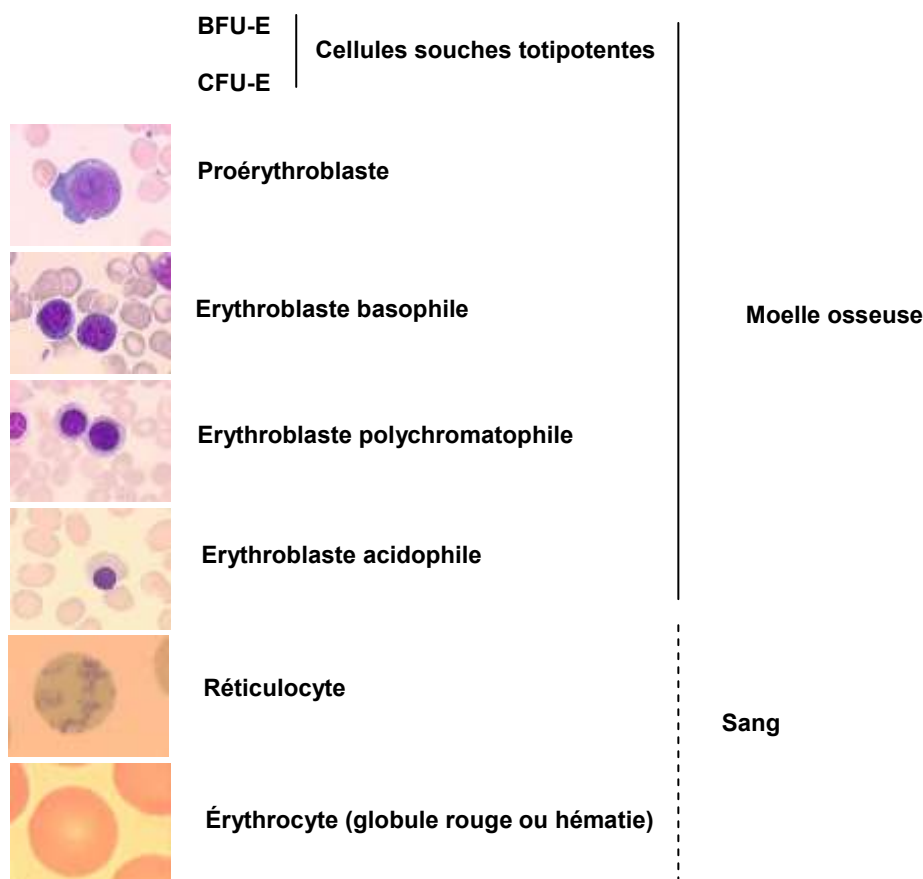
### *Rôles et caractéristiques de l'érythropoïétine (EPO)*

C'est en 1906 que Carnot et Deflandre découvrent que l'injection de sérum de lapins anémiques chez des lapins normaux augmentait de façon importante la production de globules rouges chez ces derniers (*Carnot et Deflandre 1906*). Le terme *hémopoïétine* est alors employé avant que celui d'érythropoïétine (EPO) prévaut. Sa synthèse rénale a été découverte en 1957 et le gène de la molécule identifié et cloné en 1985, permettant sa fabrication industrielle. Son utilisation médicale a été approuvée aux États-Unis en 1989.

L'EPO est une hormone produite et sécrétée (à 90%) par les cellules endothéliales des capillaires juxtatumulaires du rein sensibles à l'état d'oxygénation du sang et très abondantes dans le cortex. Le foie représente environ 10% de la production d'EPO (surtout celui du fœtus), mais le cerveau et l'utérus produisent également l'EPO. Sa synthèse est codée par un gène unique localisé sur le bras long du chromosome 7. La production d'érythropoïétine est stimulée par la baisse de l'oxygène dans les artères rénales. Une étude montre également que le taux de fer sérique intervient dans les mécanismes de régulation de la production d'EPO (*Dalle et al., 2000*). La baisse de la pression partielle en oxygène (vie en altitude), la diminution du nombre d'érythrocytes (globules rouges) causée par une hémorragie ou par une destruction excessive, ou encore l'augmentation des besoins en oxygène des tissus, entraînent une sécrétion accrue d'érythropoïétine. Au contraire, l'excès d'oxygène dans les tissus d'un organisme diminue sa sécrétion. Chez l'animal, un stimulus hypoxique entraîne l'apparition d'ARNm spécifiques de l'EPO en une heure. La demi vie de l'érythropoïétine est de 5 heures.

L'EPO est une cytokine qui intervient dans la régulation de l'érythropoïèse (*Erslev 1991*), elle agit comme un facteur de croissance permettant la multiplication et la différenciation des progéniteurs érythroblastiques BFU-E (Burst Forming Unit Erythroïde) en CFU-E (Colony Forming Unit Erythroïde) et la transformation de ce dernier en proérythroblaste (Figure 13) par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique. Elle intervient également dans la protection contre l'apoptose des cellules précurseurs et stimule la production d'hémoglobine (*Sasaki 2003*).

L'érythroblaste est le précurseur du globule rouge au niveau de la moelle osseuse. Ce dernier perd son noyau et quitte la moelle pour atteindre la circulation sanguine où il deviendra réticulocyte. Au bout de 48 heures, cet érythrocyte énucléé donnera naissance au globule rouge (ou érythrocyte mûre). Ce processus dure en moyenne une à deux semaines chez l'homme. La demi vie des globules rouges est de 20 jours environ chez la souris et 55 jours chez l'homme.



**Figure 13-Schéma simplifié de l'érythropoïèse.**

Le poids de la molécule EPO évalué en Western blot est très variable en fonction de son état de glycosylation. Le gène murin code une protéine de 192 acides aminés contenant un peptide signal de 27 acides aminés clivé lors de la sécrétion de la molécule. L'EPO est une protéine fortement glycosylée, avec des glucides O-et N-liés et des acides N-acétylneuraminiques (acides sialiques) impliqués dans la sécrétion, la demi-vie et l'activité de la molécule. *In vivo*, l'EPO perd son activité biologique par désialylation qui révèle des sites reconnus par des récepteurs hépatocytaires jouant un rôle dans son élimination. Les oligosaccharides peuvent représentés jusqu'à 40% du poids de la molécule.

### **Définition de l'insuffisance rénale chronique (IRC)**

L'insuffisance rénale chronique (IRC), urémie ou néphrite chronique, est l'atteinte progressive, importante, et définitive de la fonction rénale, et donc de la filtration glomérulaire.

L'IRC peut avoir de multiples causes comme la maladie polykystique familiale, le diabète sucré, l'hypertension artérielle, la glomérulopathie chronique (atteinte, inflammation des glomérules), la néphrite interstitielle chronique (présence de lésions avec infiltration de globules blancs entraînant une atteinte du tissu rénal interstitiel), la dilatation des voies urinaires excrétrices par obstacle, le myélome

multiple, le lupus érythémateux disséminé (LED) ou encore le Syndrome d'Alport (pathologie héréditaire affectant le collagène de type IV des membranes basales, en particulier celles des glomérules).

Toutes les maladies rénales chroniques et certaines maladies rénales aiguës incurables conduisent irrémédiablement à l'insuffisance rénale chronique dans un délai très variable : de quelques semaines à quelques dizaines d'années. On peut définir l'insuffisance rénale chronique comme la réduction irréversible de la filtration glomérulaire. L'insuffisance rénale, quelle qu'en soit la cause, est le fruit d'une réduction du nombre de néphrons actifs. Les néphrons atteints sont exclus ou détruits, les néphrons restant se comportent comme des néphrons sains. Ils assurent à eux seuls le contrôle rénal de l'homéostasie. Le rein peut assurer ses capacités excrétrices pendant très longtemps puisqu'il lui suffit de 20% de ses néphrons pour fonctionner. Lorsque les lésions touchent plus de 80% des néphrons, les troubles commencent à apparaître et l'insuffisance rénale chronique débute.

L'insuffisance rénale chronique entraîne des symptômes divers : asthénie avec anémie et amaigrissement, polyurie, troubles digestifs (anorexie, nausées, vomissements, diarrhée, hémorragies digestives), ou troubles neurologiques (multinévrite avec impatience des jambes, fatigue des mollets, paresthésies, impotence des membres inférieurs). Dans les cas très sévères, on note des troubles psychiques avec confusion mentale, désorientation, torpeur, des signes cardiaques, des troubles osseux, des troubles cutanés et des infections urinaires. Et à un stade plus avancé, l'anémie provoque une pâleur jaunâtre, une tachycardie, une mauvaise tolérance à l'effort, et une asthénie.

L'anémie est souvent constante dans l'IRC et provient très majoritairement du défaut de production d'érythropoïétine. La nature de la maladie initiale ayant entraîné l'IRC a peu d'influence sur le degré de l'anémie (elle est cependant plus rare et moins profonde dans le rein polykystique). L'installation est lente et progressive, et ce ne sera que très rarement le symptôme révélateur de la maladie rénale. Il existe en revanche une certaine relation entre la clairance à la créatinine et le degré de l'anémie (apparition dès que la clairance à la créatinine est < 40 ml/min chez l'homme). La gravité de l'insuffisance rénale chronique est estimée par la clairance de la créatinine. La formule de Cockcroft et Gault permet de façon rapide et fiable, d'estimer la clairance de la créatinine lorsqu'on peut disposer d'urines de 24 heures (*Cockcroft et Gault. 1976*). La fiabilité de cette formule est suffisante pour qu'on l'utilise sur des sujets adultes (20 à 100 ans) dont le poids est compris entre 50 et 75 Kg.

Voici cette formule :

$$Cl(\text{Homme}) = 1,23 \times P \times (140 - \text{Age}/\text{Créatm})$$

$$Cl(\text{Femme}) = 1,04 \times P \times (140 - \text{Age}/\text{Créatm})$$

avec Age en années, P en Kg, Créatm en  $\mu\text{mol/L}$ , le résultat en ml/min.

L'insuffisance rénale est :

**-modérée** lorsque la clearance de la créatinine est comprise entre 50 et 80 ml/min,

**-importante** entre 15 et 50 ml/min,



- grave** ou **terminale** au dessous de 15 ml/min,
- impose l'épuration extrarénale au dessous de 10 ml/min.

Plusieurs autres variables biologiques sont à prendre en compte : l'urée sanguine s'élève rapidement, l'hyperuricémie est fréquente, l'hyperkaliémie peut être mortelle, l'acidose métabolique, les déséquilibres hydro-électrolytiques, les troubles phosphocalciques (hypocalcémie, hyperphosphorémie) sont importants. L'abaissement des vitesses de conduction nerveuse motrice et sensitive détecte la neuropathie périphérique sensitivo-motrice.

L'analyse de l'hémogramme permet de diagnostiquer une anémie à partir d'un taux d'hémoglobine compris entre 6 et 8 g/dl. L'anémie est habituellement normochrome normocytaire. Le degré d'hydratation très variable de ces patients fait que l'anémie peut être majorée ou minorée à l'hémogramme (déshydratation fréquente). L'anémie est non régénérative (on peut cependant observer une légère réticulocytose quand le taux de créatinine est très augmenté) et la morphologie érythrocytaire sur frottis est dans la plupart des cas normale. On peut cependant observer des échinocytes (hématies crénelées) en relation avec le pH et l'état ionique du plasma (fréquents quand le taux de l'urée dépasse 1,5 g/l). Les leucocytes et les plaquettes sont le plus généralement en nombre normal avec parfois une très discrète polynucléose neutrophile et une thrombopénie (10 % des patients en IRC).

Le myélogramme est soit normal ou riche, avec petite augmentation du nombre d'érythroblastes (morphologie normale) ; un nombre d'érythroblastes diminué se rencontre plutôt dans l'IR aiguë.

Enfin, le statut martial varie selon les patients : normal, parfois excès de fer, ou carence selon qu'il existe ou non des complications. En pratique on n'explore pas plus avant l'anémie de l'IRC quand celle-ci paraît à l'évidence simplement en rapport avec un défaut de production d'EPO.

### **Traitement de l'IRC**

Au début, lorsque l'insuffisance rénale chronique n'est pas très avancée, un régime et des conseils hygiéno-diététiques sont suffisants. Aux stades très évolués, seule l'hémodialyse périodique par rein artificiel (épuration extrarénale), la dialyse péritonéale ou la transplantation rénale peuvent améliorer la qualité de vie des malades. Toutefois, la dialyse ne remplace pas toutes les fonctions du rein défaillant et certaines complications sont possibles et nécessitent une surveillance étroite.

De façon à corriger l'anémie, il est administré aux patients atteints d'IRC de l'**EPO recombinante** par voie intraveineuse ou sous-cutanée. Les patients sont traités si le taux d'hémoglobine est inférieur à 8 g/dl et le traitement est maintenu et renouvelé jusqu'à ce que le taux d'hémoglobine atteigne et se stabilise entre 11 et 12 g/dl. Une résistance à l'EPO (réponse incomplète ou nécessitant des doses importantes) peut s'observer, dans ce cas il est conseillé de rechercher une carence martiale, une intoxication à l'aluminium, une dialyse insuffisante, un hyperparathyroïdisme, une carence folates, ou des maladies libérant des cytokines inhibitrices (infection, inflammation, tumeurs).

La mise en évidence d'anticorps neutralisants dirigés contre l'EPO recombinante mais aussi contre l'EPO endogène a été décrite chez des patients traités en sous cutanée avec les EPO humaines recombinantes  $\alpha$  et  $\beta$  (rHuEPO $\alpha$  : *Eprex*<sup>TM</sup>, *Erypo*<sup>TM</sup>, rHuEPO $\beta$  : *NeoRecormon*<sup>TM</sup>) (Casadevall 2002a, Casadevall 2003). Aucun cas n'a été déclaré à l'heure actuelle chez des patients traités avec de la Darbépoïétine  $\alpha$  (*Aranesp*<sup>TM</sup>). Les mécanismes mis en jeu ne sont pas bien compris. Une glycosylation aberrante de la protéine recombinante est suspectée (Casadevall et al., 2002b). L'incidence des érythroblastopénies chroniques acquises après traitement à l'EPO recombinante a augmenté significativement depuis 1998, la fréquence serait de l'ordre de 20 nouveaux cas pour 100 000 patients traités (Locatelli et al., 2004). Cette augmentation pourrait également correspondre à un changement de la formulation des préparations d'*Eprex*<sup>TM</sup> distribuées en Europe (Eckardt et Casadevall., 2003, Hermeling et al., 2003, Boven et al., 2005a, Boven et al., 2005b). La sérum albumine humaine (HSA, Human Serum Albumin) utilisée comme stabilisant a été remplacée par le polysorbate 80 et la glycine. Cette nouvelle formulation serait moins stable et favoriserait la formation d'agrégats dans certaines conditions. Des traces de silicone utilisé comme lubrifiant des seringues d'injection prêtes à l'emploi pourraient également augmenter l'immunogénicité de la préparation. Des protocoles d'immunosuppression (corticostéroïdes et cyclophosphamide) permettent une disparition des anticorps dans 70% des cas, alors qu'un arrêt simple d'administration de l'EPO recombinante sans immunosuppression est rarement efficace.

En parallèle et à plus ou moins long terme une **dialyse péritonéale ambulatoire** est préconisée. Dans les cas d'insuffisance rénale terminale, la **transplantation rénale** est la seule solution thérapeutique. Si la greffe est réussie, l'anémie se corrige dans les 3 mois qui suivent. Une polycythémie secondaire de rebond est décrite pour 20% des patients, parfois par sécrétion inappropriée d'EPO, souvent par hypersensibilité des progéniteurs à l'EPO.

### Transfert de gène codant l'EPO pour le traitement de l'anémie

Deux types d'applications thérapeutiques du transfert de gène de l'EPO peuvent être envisagés :

#### ***1. Les anémies nécessitant des doses importantes d'EPO recombinante pour être financièrement supportables.***

L'histoire du transfert de gène codant l'EPO a été en partie reliée aux  $\beta$ -thalassémies pour un objectif de thérapie à court terme. Les thalassémies constituent un ensemble hétérogène de maladies génétiques dues à des anomalies des gènes de l'hémoglobine. Lors des  $\beta$ -thalassémies, l'anomalie de synthèse de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine conduit à un déséquilibre entre la chaîne  $\alpha$  qui est normalement synthétisée et la chaîne  $\beta$  qui est absente ou en quantité plus faible. Les chaînes  $\alpha$  normalement synthétisées sont alors en excès et précipitent sur les membranes des globules rouges, ce qui provoque leur destruction et conduit à une anémie hémolytique. L'EPO recombinante ou le gène

codant l'EPO peuvent être administrés pour corriger l'anémie et pour compenser le déficit en chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine adulte en stimulant la production d'hémoglobine fœtale (HbF contenant 2 chaînes  $\alpha$  et 2 chaînes  $\gamma$ ) (Perrine 2005, Samakoglu et al., 2001, Payen 2001a). Mais des travaux récents montrent que l'utilisation de vecteurs rétroviraux permet de traiter la cause de la maladie génétique en transférant l'ADNc de la  $\beta$ -globine dans des cellules souches hématopoïétiques de façon à corriger le phénotype de modèles murins  $\beta$ -thalassémiques et drépanocytaires (Pawliuk et al., 2001, Imren et al., 2002, Oh et al., 2004).

**2. Depuis 1988, l'EPO recombinante humaine est commercialisée pour le traitement de l'anémie chronique due à une insuffisance de sécrétion d'érythropoïétine**, dans le cas d'atteintes cardiaques (Iyengar et Abraham., 2005) ou encore de certains cancers (Hardee et al., 2006). Elle est en effet, utilisée lors de certaines chimiothérapies aplasiantes car cette hormone a un effet protecteur vis-à-vis des cellules souches érythrocytaires. De nombreuses applications sont actuellement à l'étude : insuffisance rénale terminale, anémies inflammatoires, polyarthrite rhumatoïde, anémies des sujets HIV traités par zidovudine (AZT), anémies réfractaires, autotransfusion. C'est surtout pour le traitement de l'anémie acquise au cours de l'insuffisance rénale chronique que l'EPO recombinante est employée en clinique (Marsden., 2006). Le transfert de gène de l'EPO a été décrit récemment comme une technique envisageable pour le traitement de l'anémie chez des rats et des patients insuffisants rénaux (Rizzuto et al., 2000, Maruyama et al., 2001, Ataka et al., 2003, Lippin et al., 2005).

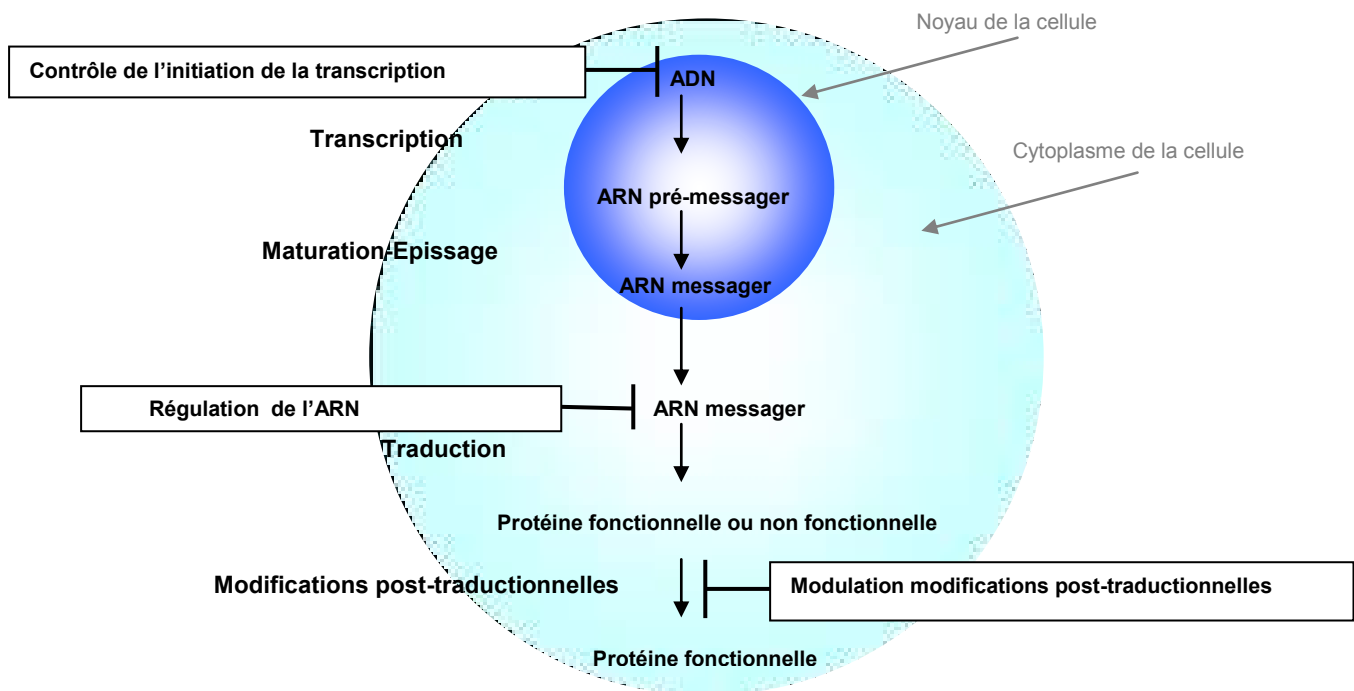
**C'est dans ce contexte que s'incrivent en partie les travaux présentés dans ce manuscrit. Notre étude consiste à étudier le transfert du gène codant l'érythropoïétine dans le muscle squelettique à l'aide de copolymères à blocs pour le traitement de l'anémie dans un modèle de souris en insuffisance rénale chronique.**

## 6. Les systèmes de régulation pour le transfert de gènes codant des protéines sécrétées.

La sécrétion de protéines à partir de tissus cibles génétiquement modifiés, en comparaison à l'injection de protéines recombinantes, peut présenter des avantages notables en terme de coût et de simplicité de traitement. Toutefois, de telles applications supposent que l'on soit capable de contrôler le niveau d'expression du transgène. La sur-expression du transgène peut entraîner des effets secondaires préjudiciables, il faut donc être en mesure de réguler finement la quantité de protéines sécrétées, de manière à maintenir cette quantité dans une fenêtre thérapeutique et à assurer une efficacité biologique optimale. Pour un développement sûr, il est également préférable de pouvoir arrêter à la demande l'expression du transgène, si l'on veut mettre un terme provisoire ou définitif au traitement. L'expression du gène doit donc pouvoir être éteinte à tout moment, être parfaitement tolérée et ne générer aucune anomalie locale ou générale. La régulation de l'expression d'un transgène est donc un critère d'efficacité et surtout de sécurité.

En effet, les premiers essais cliniques de thérapie génique pour la sécrétion de protéines n'ont pas nécessité une expression régulée du transgène parce que les protéines impliquées dans la pathologie ont un large indice thérapeutique (comme l' $\alpha_1$ AT ou les facteurs de coagulation VIII et IX). Mais, beaucoup de pathologies sont hétérogènes et impliquent la sécrétion de protéines qui ont une fenêtre thérapeutique limitée pendant un temps précis. Par exemple le développement d'une polyglobulie faisant suite à une sur-expression de l'érythropoïétine après transfert de gène limiterait l'intérêt d'un tel traitement, particulièrement chez les patients insuffisants rénaux (aggravation ou risque d'hypertension ou de thrombose) (Heinicke et al., 2006). Le transfert de gène de l'insuline envisagé pour le traitement du diabète doit aussi absolument être optimisé de façon à permettre une sécrétion finement régulée de la protéine (Croze et Prud'Homme 2003). De même, une sécrétion non régulée de l'hormone de croissance pour le traitement du nanisme aboutit à des dérèglements hormonaux ou au développement de cancers (Draghia-Akli et al., 2002).

Ainsi de nombreux systèmes de régulation ont été mis au point pour réguler artificiellement l'expression d'un gène ou ses produits. Trois approches de régulation ont été envisagées : agir soit en amont de la synthèse de l'ARNmessenger en modulant l'activité du promoteur qui contrôle la transcription du gène, soit en aval de la transcription en contrôlant certains paramètres comme la maturation des ARN, leur transport du noyau au cytoplasme, leur stabilisation et leur traduction en protéines. Le dernier niveau de régulation concerne les modifications post-traductionnelles de la protéine elle-même (Figure 14).



*Figure 14 -Schéma général de la synthèse d'une protéine avec les différentes étapes de transcription et de traduction ainsi que les trois stratégies de régulation décrites dans la littérature.*

## 6.1. Régulation par un contrôle de l'initiation de la transcription

Certains facteurs de transcription sont exprimés de façon ubiquitaire. D'autres, par contre, ne sont exprimés ou fonctionnels que dans certains types cellulaires et/ou dans certaines situations physiologiques. Fondées sur ces observations, deux familles de systèmes de régulation de l'expression génétique ont été développées.

- Les systèmes endogènes, qui utilisent des séquences régulatrices connues de promoteurs endogènes pour activer la transcription en réponse à des signaux intracellulaires spécifiques d'un état physiologique ou d'un composé chimique.

- Les systèmes exogènes, qui sont basés sur un facteur de transcription chimérique qui se lie sur des sites de fixation spécifiques placés en amont du promoteur du gène d'intérêt, et active ou réprime la transcription en réponse à un inducteur exogène. Le facteur de transcription est inactif à l'état de base et n'est activateur ou répresseur que par fixation d'un ligand exogène inducteur ou répresseur. Idéalement, l'administration du ligand conditionne l'expression du gène d'intérêt.

Pour être utilisable dans différents domaines d'application, et particulièrement pour une utilisation en thérapie génique, il est important de sélectionner un système de modulation de l'expression qui permette une induction rapide, précise et réversible des gènes d'intérêt. Ainsi, on peut définir le système de régulation idéal comme celui qui répond aux critères suivants :

- **spécificité** : le système ne doit pas interférer avec les réseaux de régulation endogènes et ne doit pas être activable par un ligand endogène.
- **sélectivité** : l'induction doit se faire uniquement par un inducteur exogène non toxique
- **inductibilité** : le système doit avoir un niveau d'expression basal faible et une induction rapide et élevée.
- **biodisponibilité** : l'inducteur doit être une drogue biodisponible par voie orale préférentiellement.
- **réversibilité** : l'inducteur doit avoir une cinétique d'élimination rapide dans tous les tissus pour permettre des cycles répétés et rapides d'induction ou de répression.
- **immunogénicité** : l'activateur de transcription et l'inducteur doivent avoir un faible potentiel immunogène.
- **dose-dépendance** : la réponse du système doit être modulable par variation de la concentration de l'inducteur. La dose assurant l'efficacité biologique doit par ailleurs être dénuée d'effets secondaires ou de toxicité.
- **«ON» switch** : l'inducteur doit activer la transcription («ON» switch) plutôt que l'inhiber («OFF» switch). Les systèmes «OFF» posent en effet plusieurs problèmes : ils nécessitent pour éteindre le système une exposition prolongée à la drogue inductrice et les cinétiques d'inductions dépendent fortement des cinétiques d'élimination de la drogue.
- **flexibilité** : les composantes du système de régulation doivent pouvoir être facilement modulables (mutations ponctuelles par exemple) pour une optimisation éventuelle ou une adaptation du système à différentes configurations thérapeutiques ou tissus spécifiques.

#### a. Systèmes existants basés sur des éléments exogènes

Quatre systèmes majeurs basés sur des facteurs de transcription chimériques qui activent le promoteur du gène cible après administration de petites molécules ont été mis au point pendant ces dernières années.

Leur régulation peut se faire grâce à :

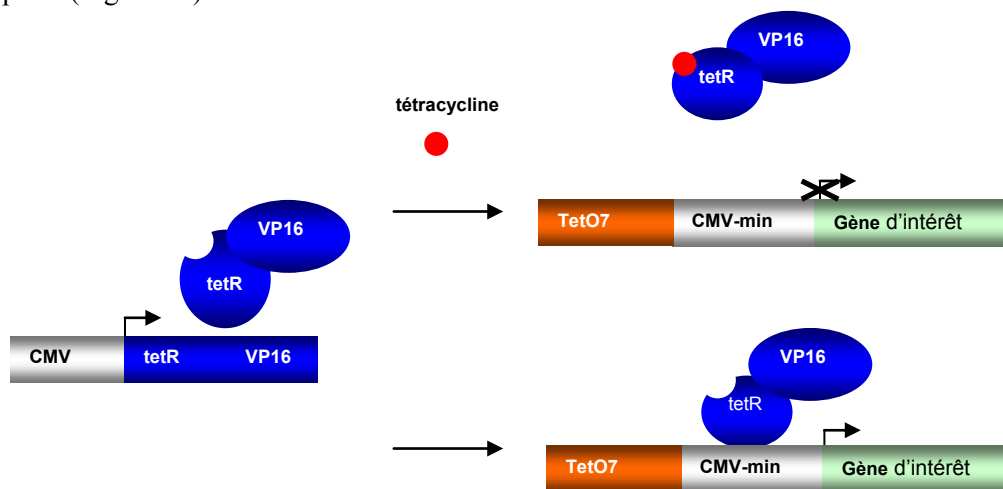
- un antibiotique de la famille des tétracyclines,
- l'ecdysone, une hormone stéroïdienne d'insecte
- la mifépristone (RU486) : un antiprogestatif,
- des molécules de dimérisation comme la rapamycine.

Les trois premiers reposent sur une régulation allostérique alors que le dernier utilise le principe d'induction par proximité.

### i. Systèmes régulables par la tétracycline

#### • Système suppressible par la tétracycline : Tet-Off

Le système régulable à la tétracycline a été développé initialement par Gossen et Bujard en 1992 sous le nom de système Tet-Off (*Gossen et Bujard., 1992*). Ce système est basé sur les éléments de régulation de l'opéron du gène de résistance à la tétracycline du transposon Tn10 d'*Escherichia coli*. Chez la bactérie, la résistance à la tétracycline est assurée par une protéine dont l'expression est induite par l'antibiotique. L'induction se fait au niveau transcriptionnel en déplaçant par changement conformationnel une protéine répresseur de la transcription (tetR), normalement fixée sur une séquence opératrice nommée tetO. Pour créer le système initial Tet-Off suppressible par la tétracycline, une protéine de fusion transactivatrice artificielle tTA (Tetracycline-controlled TransActivator) été construite en fusionnant le domaine de transactivation de la protéine VP16 du virus de l'herpès simplex avec le domaine de liaison à tetO de la protéine tetR. Le résultat est donc une protéine de fusion activatrice de transcription et sensible à la tétracycline. Sept copies de la séquence de tetO ont été placées en amont du promoteur minimal dérivé du Cytomégalovirus (promoteur CMV-min). Ainsi, en absence de tétracycline, la protéine de fusion tTA se fixe sur tetO et active la transcription. Par contre en présence de tétracycline, la protéine tTA subit un changement de conformation ce qui diminue son affinité pour tetO et inactive ainsi indirectement l'initiation de la transcription (Figure 15).



**Figure 15-Schéma du système suppressible par la tétracycline Tet-Off**

Une induction d'un facteur  $10^5$  a été reportée dans des cellules HeLa exprimant tTA constitutivement en passant de 1mM à une absence totale de tétracycline dans le milieu de culture (*Gossen et Bujard., 1992*). Ce système de régulation a également été utilisé avec succès *in vivo* avec le gène de l'érythropoïétine chez la souris (*Bohl et al., 1997*). Ce système a été également utilisé pour construire des systèmes hybrides dérivés régulant le gène codant le VEGF (vascular endothelial growth factor) chez la souris (*Vincent, K.A. et al., 2000*).

• **Système inductible par la tétracycline : Tet-On**

Le principe du système Tet-Off implique d'administrer l'antibiotique inhibiteur pour annuler l'expression du gène d'intérêt. Ceci risque, dans certains cas, de nécessiter des traitements assez longs avec l'antibiotique. C'est pourquoi, à partir de ce système Tet-Off supprimable par la tétracycline, le groupe de Bujard a développé en 1995 un système inductible par la tétracycline appelé Tet-On (Gossen *et al.*, 1995). Quatre acides aminés du tetR ont été modifiés pour créer une version rtetR (reverse tetR) qui présente des caractéristiques opposées au tetR. Sans affinité pour les séquences tetO en l'absence de tétracycline, elle s'y fixe avec une forte affinité en présence de l'inducteur (Figure 16). Fusionnée au domaine VP-16, elle a été baptisée rtTA (reverse Tetracycline-controlled TransActivator). Ce système a montré une bonne inductibilité en réponse à la tétracycline ou son analogue la doxycycline : un facteur de plus de 1000 fois a été observé dans des cellules HeLa exprimant le rtTA de manière constitutive en ajoutant de la doxycycline dans le milieu de culture (Gossen *et al.*, 1995). L'utilisation de souris transgéniques exprimant de façon constitutive tTA et rtTA a montré qu'il était possible d'obtenir une induction et une dé-induction rapide (de 9 à 24 heures) dans tous les tissus (Kistner *et al.*, 1996).

Bien qu'efficace, les applications *in vivo* de ce système inductible originel ont montré une expression basale plus importante que le système Tet-Off, probablement due à une fixation résiduelle non spécifique du transactivateur sur les séquences tetO en absence d'inducteur. Quelques-unes sont relatées dans la littérature (Bohl *et al.*, 1997, Bohl *et al.*, 1998, Serguera *et al.* 1999). Une étude récente a montré que les facteurs de transcription endogènes de la famille des GATA, en venant se fixer avec une faible affinité sur des séquences consensus présentes dans le site de fixation tetO, avaient un effet négatif sur le bruit de fond basal et un effet positif sur l'inductibilité du système (Gould *et al.*, 2004).

De nombreuses modifications ont récemment été apportées au système Tet-On afin de réduire le niveau basal d'expression et d'augmenter l'efficacité du système en réponse à la doxycycline. Le progrès majeur a été l'isolement de deux nouveaux variants de rtTA, baptisés rtTA2<sup>S</sup>-S2 et rtTA2<sup>S</sup>-M2 (Urlinger *et al.*, 2000). Ils sont caractérisés par une activité transcriptionnelle quasi-nulle en l'absence d'inducteur *in vitro* (Urlinger *et al.*, 2000) et *in vivo* (Chenuaud *et al.*, 2004a). En effet, des mutations dans le domaine bactérien rTetR leur confèrent une affinité moindre pour les séquences tetO en l'absence d'inducteur (Urlinger *et al.*, 2000). rtTA2<sup>S</sup>-S2 présente un niveau basal légèrement plus faible que rtTA2<sup>S</sup>-M2, mais les niveaux d'induction sont plus élevés pour la version rtTA2<sup>S</sup>-M2, donnant une activité transcriptionnelle maximale *in vitro* pour des concentrations de doxycycline dix fois moindre en comparaison à la première version du transactivateur (Urlinger *et al.*, 2000).

Le domaine d'activation de la transcription cloné dans les premières versions (128 acides aminés de l'extrémité C-terminale de la protéine VP16 d'HSV (Gossen *et Bujard.*, 1992) a été remplacé par trois répétitions d'un domaine minimal de VP16 de 12 acides aminés, baptisé « F » (Baron *et al.*, 1997). Cette modification permet d'obtenir des protéines moins toxiques et mieux tolérées dans des cellules



HeLa, rendant donc moins immunogènes les transactivateurs (Urlinger *et al.*, 2000). Enfin, la séquence codant elle aussi a été modifiée afin d'augmenter l'expression dans des cellules eucaryotes conduisant à l'élimination de sites donneurs et accepteurs d'épissage, de motifs probables de reconnaissance par des endonucléases et de séquences pouvant conduire à la formation de structures secondaires de l'ARNm (Urlinger *et al.*, 2000).

Un contrôle plus strict du bruit de fond résiduel du système Tet-On a également été obtenu en rajoutant un répresseur de transcription, ou «silencer» tTS (tetracycline transcriptional silencer) sous contrôle également de la tétracycline (Figure 16). Le tTS est le résultat de la fusion du domaine répresseur KRAB (Kruppel-associated Box) de la protéine humaine Kid-1 avec le répresseur de la transcription tetR initial (Freundlieb *et al.*, 1999). La co-expression du rtTA et d'un tTS permet une régulation très sensible : en absence de doxycycline, le tTS se lie au tetO et inhibe la transcription basale ; en rajoutant la doxycycline, le tTS se dissocie de sa cible ADN pendant que le rtTA devient actif et active la transcription. Plusieurs études semblent montrer effectivement qu'un tel système dual rtTA/tTS réduit de façon significative le bruit de fond basal de l'expression d'un transgène *in vivo* (McGee Sanftner *et al.*, 2001 Salucci *et al.*, 2002, Lamartina *et al.*, 2003, Mizuguchi *et al.*, 2003). Les versions les plus évoluées du système Tet-On combinent même les variants du rtTA, rtTA2s-S2 et rtTA2s-M2, avec le répresseur tTS (Salucci *et al.*, 2002, Lamartina *et al.*, 2003, Mizuguchi *et al.*, 2003).

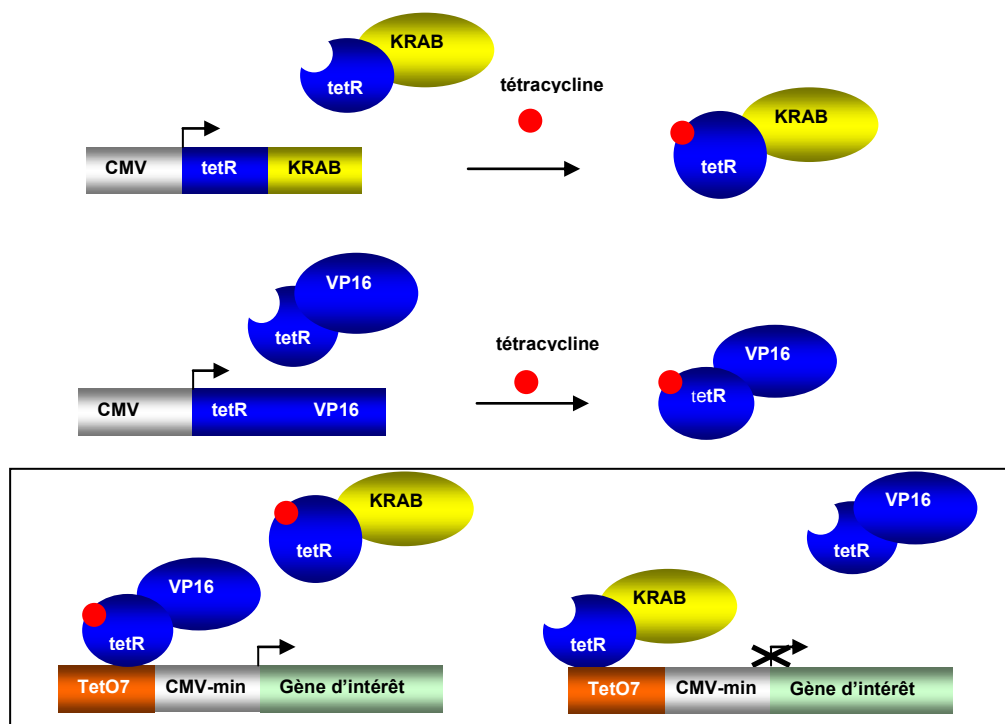


Figure 16-Schéma du système inductible par la tétracycline Tet-On + tTS.

Les systèmes Tet sont de loin les systèmes de régulation les plus utilisés actuellement. Une de leurs originalités repose sur l'origine procaryote des séquences tetR/rtetR et tetO qui assure une réponse spécifique et l'absence d'effets pléiotropiques.

De plus, la doxycycline est un antibiotique non toxique pour les cellules de mammifères, dont la pharmacologie est bien connue et dont l'administration semble bien tolérée par les patients. La doxycycline est disponible par voie orale, a une demi-vie de 6 heures et a l'avantage de bien pénétrer dans les tissus, elle est capable de traverser les barrières placentaire et hémato-encéphalique. Les dérivés de la tétracycline : doxycycline et anhydrotétracycline, actifs à des doses 100 fois inférieures à la tétracycline sont bien tolérés au moins à court et moyen terme (quelques mois) (*Gossen et al., 1995*). La demi-vie de la molécule est de 6 heures mais des différences notables sont observées entre les organes et sont donc à prendre en compte lors de l'activation partielle au sein d'un tissu spécifique (*Baron et Bujard., 2000*). Le seul inconvénient est que des traitements *in vivo* prolongés avec la doxycycline peuvent conduire à son accumulation dans les os ce qui a pour conséquence une libération lente de la drogue et donc une extinction du système Tet-On plus lente. Ceci représente une limitation pour des utilisations sur de longues périodes. Il faut également noter une possible résistance à cet antibiotique au cours du temps bien que cet antibiotique soit de moins en moins utilisé.

## ii. Système inductible par l'ecdysone

Chez les insectes, l'ecdysone active une série d'événements transcriptionnels via un récepteur hétérodimérique formé du récepteur nucléaire EcR et du produit du gène ultraspirale (UPS). En présence de l'hormone, le récepteur EcR, complexé à USP se lie à des éléments de réponse et permet une transactivation de la transcription. Ce système naturel de régulation a été modifié pour être utilisable chez les mammifères (*No et al., 1996*). Un récepteur chimérique contenant le domaine de transactivation de VP16 fusionné à la partie NH2 terminale du récepteur EcR muté (conservant sa sensibilité pour l'ecdysone et son site de liaison à l'ADN) a été construit. Le gène de l'USP a été remplacé par son homologue chez les mammifères : le récepteur alpha au rétinol X (RXR). Il a été montré que les facteurs d'induction étaient supérieurs lorsqu'on exprimait EcR en présence du récepteur RXR (*Thomas et al., 1993*). Ainsi, en présence d'ecdysone ou de son analogue synthétique la muristérone A, le complexe hétérodimérique (VP16-EcR/RXR) se lie à des séquences spécifiques RE (response element) situées en amont du promoteur basal du gène d'intérêt et active la transcription (Figure 17).

Ce système ecdysone a donné des résultats très encourageants *in vitro* (*Christopherson et al., 1992*) et *in vivo* (*No et al., 1996*) et présente de nombreux avantages de par la nature de l'inducteur. L'ecdysone et son analogue synthétique, la muristérone A, sont de nature lipophile comme les autres hormones stéroïdes. Elles possèdent donc une distribution tissulaire large, y compris cérébrale, et une demi-vie courte qui permet une induction précise sans accumulation tissulaire. Aucun effet toxique ou tératogène n'a été montré chez la souris (*No et al., 1996*) mais l'ecdysone possède des propriétés

pharmacologiques peu connues chez l'homme puisqu'elle n'est pas utilisée en médecine contrairement aux autres inducteurs. De plus, la surexpression du récepteur RXR risque d'entraîner des interactions avec d'autres voies de signalisation endogènes.

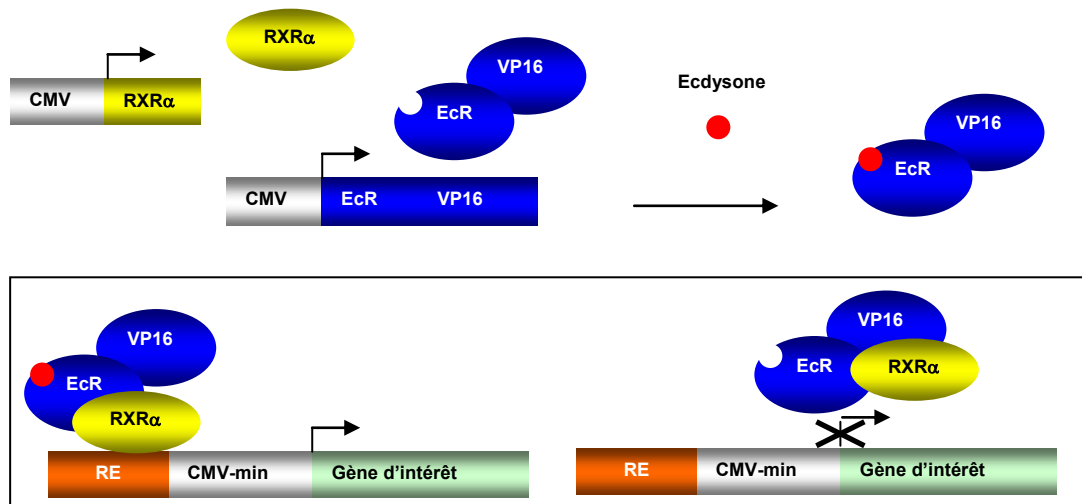


Figure 17-Schéma du système inductible par l'ecdysone

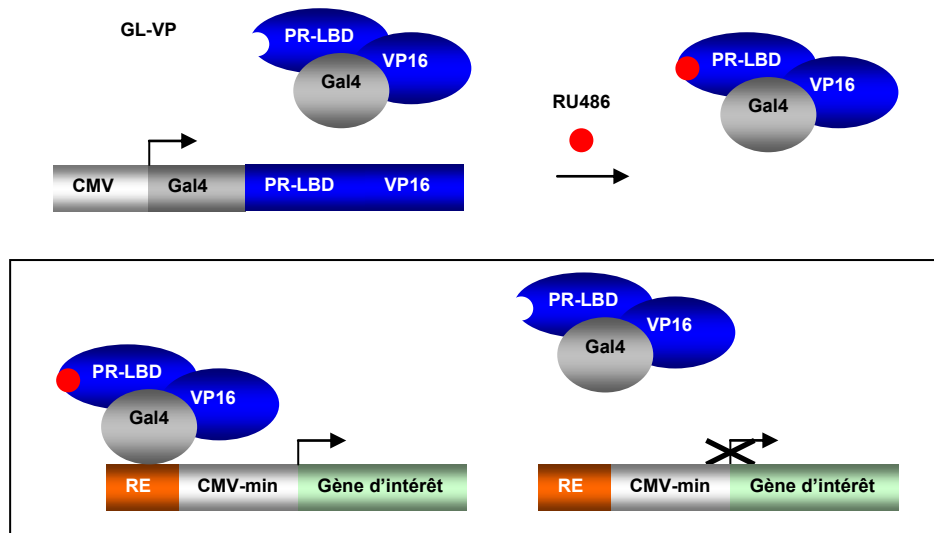
### iii. Système inductible par la mifépristone/RU486

Ce système utilise une version mutée du récepteur à la progestérone humaine (hPR). Une délétion de 42 acides aminés de la région C-terminale du récepteur humain à la progestérone (domaine de liaison au ligand) a permis d'obtenir un mutant hPRB891 ou PR-LBD. Ce dernier a perdu sa capacité à lier les progestérones mais se lie aux antagonistes de la progestérone comme la mifépristone (RU486).

Une protéine transactivatrice chimère GL-VP a été construite en fusionnant le domaine de fixation du ligand de hPR avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription de levure Gal-4 (afin d'écarter l'éventualité d'une activation d'un gène endogène répondant aux progestérones) et le domaine d'activation de VP16 (Wang et al., 1994, Delort et Capecchi., 1996). Le promoteur inductible est constitué de plusieurs sites de fixation de Gal-4 en amont du promoteur basal du gène d'intérêt (Figure 18). Ce système, transfecté transitoirement dans des cellules permet une induction d'un facteur 50 en présence de 1 nM de RU486.

Dans le but d'éliminer la protéine VP16 potentiellement immunogène, le domaine d'activation VP16 a été substitué par partie transactivatrice (acides aminés 286 à 550) du domaine d'activation p65 de la sous unité du facteur de transcription NFκB humain (Burcin et al., 1999). Dans le même objectif, le domaine de liaison à l'ADN Gal4 de levure pourrait être remplacé par ZFHD1 (voir ci dessous). Cependant, la longue demi-vie (20 à 30 heures) de RU486 et sa diffusion lente dans les tissus constitue un obstacle à son développement. Un inconvénient supplémentaire de ce système est la propriété abortive du composé RU486 ce qui rend impossible son utilisation clinique (Agha-Mohammadi et al., 2000).

Malgré tout, ce système vient être utilisé dans un essai clinique de phase I qui vient de débiter (Investigateur : Popat U). Dans cet essai le gène d'intérêt thérapeutique, la GHRH, est délivré par injection intramusculaire d'ADNnu.



**Figure 18-Schéma du système inductible par la mifepristone/RU486**

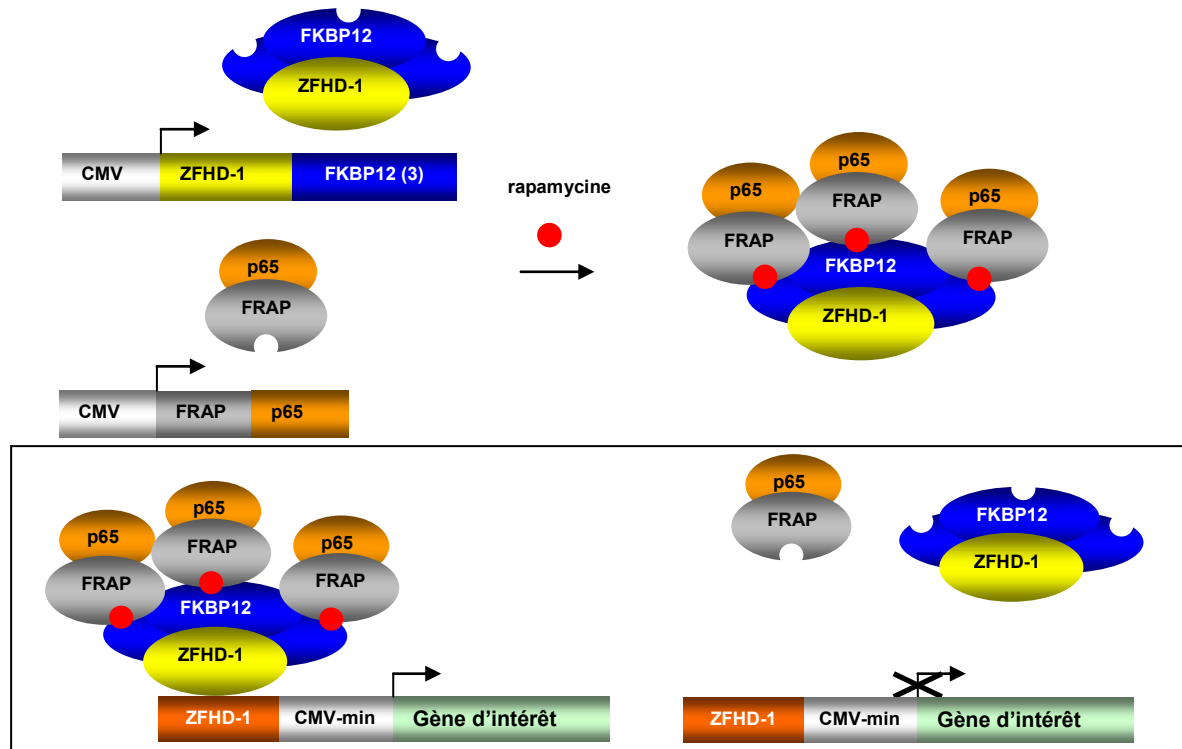
#### iv. Système inductible par la rapamycine

Ce système repose sur le contrôle de la dimérisation de deux protéines chimériques, inactives à l'état de monomère, et qui constituent un facteur de transcription en hétérodimère. L'une des protéines contient le domaine de liaison à l'ADN et la seconde le domaine d'activation de la transcription. Les deux contiennent des domaines de liaison au ligand. La fixation du ligand entraîne la formation de l'hétérodimère.

Dans le premier système décrit, la première protéine chimère est une fusion entre le domaine de liaison à l'ADN ZFHD-1 dérivé du FRAP humain (FKBP12-rapamycin-associated protein) et trois domaines de liaison à la rapamycine de la protéine humaine FKBP12. ZFHD-1 résulte de la fusion de l'homéodomaine Oct-1 avec deux doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN Zif268, ainsi ZFHD-1 se fixe sur une nouvelle séquence qu'aucun facteur de transcription connu de mammifère ne reconnaît (*Pomerantz et al., 1995*).

La seconde protéine chimère du système contient le domaine de liaison à la rapamycine de la protéine cellulaire humaine FRAP associée au domaine de transactivation p65 de la protéine NFκB. L'interaction de la rapamycine ou de son analogue FK506 avec FKBP12 et FRAP entraîne la constitution d'un activateur de transcription qui active le promoteur inductible comportant le site de fixation de ZFHD-1 répété 12 fois (Figure 19). Ce système présente l'avantage que les protéines chimères qui le composent sont d'origine humaine et donc susceptibles d'être bien tolérées chez l'homme. En effet, l'utilisation exclusive d'éléments dérivés de protéines humaines permet de réduire

le risque de réaction immunitaire. Un autre avantage de ce système réside dans l'identification d'un domaine de liaison à l'ADN d'origine humaine qui n'active aucun gène endogène et dont les sites de liaison sont reconnus par aucun facteur de transcription endogène comme ZFHD1.



**Figure 19-Schéma du système inductible par la rapamycine.**

Une limitation du système est liée aux propriétés immunosuppressives de la rapamycine ou de son analogue FK506 qui pourraient ainsi conduire à des effets pleïotropiques dans les cellules cibles. L'utilisation de dérivés non-immunosuppresseurs s'impose pour une application thérapeutique. La synthèse de certains d'entre eux a déjà été publiée. L'incorporation d'une mutation dans le domaine FRAP, par exemple permet à ce système de fonctionner avec des analogues dénués d'activité immunosuppressive (Pollock et Rivera., 1999, Pollock et al., 2000, Pollock et Clackson., 2002).

La rapamycine et ses analogues sont disponibles par voie orale et possèdent des propriétés pharmacocinétiques connues : compte tenu de la biodisponibilité de 15 à 20 % de la rapamycine, le pic de concentration sérique est atteint 20 minutes après administration orale de 0.04 à 1 mg/kg chez la souris et sa demi-vie est de 4.5 heures (Magari et al., 1997, Rivera et al., 1999).

Ce système, introduit dans des vecteurs AAV, a permis après injection dans des muscles squelettiques de souris et de primates une régulation dose-dépendante de la sécrétion d'hormone de croissance ou d'érythropoïétine pendant plusieurs mois (Rivera et al., 1999, Xe et al., 1999, Rivera et al., 2005). La dernière étude de Rivera publiée en 2005, montre qu'une construction unique contenant les trois éléments nécessaires au fonctionnement du système introduite dans des vecteurs AAV induisait un niveau basal moindre en absence d'inducteur mais un niveau d'induction aussi plus faible (Rivera et

*al.*, 2005). En effet, il avait déjà été démontré que la construction d'une cassette d'expression bicistronique grâce à une séquence d'entrée interne du ribosome (IRES) permettant l'expression simultanée des deux protéines régulatrices à partir d'un même transcrit, réduit significativement l'inductibilité du système (*Go et Ho.*, 2002). Il semble que la surexpression du domaine de liaison à l'ADN exerce un effet inhibiteur sur le gène rapporteur.

L'expression constitutive et de longue durée des protéines chimériques souvent d'origine exogène pose des problèmes de réaction immunitaire. Les données sont insuffisantes pour savoir si les systèmes de régulation sont immunogènes chez l'homme. Il est vrai qu'en terme d'immunogénicité, le système rapamycine amélioré semble le plus adéquat chez le primate pour contrôler à long terme l'expression d'un transgène *in vivo* (*Rivera et al.*, 2005). Aucune réaction immunitaire contre les éléments du système inductible par la tétracycline n'a été décelée chez le petit animal, comme la souris, après injection intramusculaire (*Rizzuto et al.*, 1999, *Lamartina et al.*, 2002). Ces résultats ne sont cependant pas toujours transposables aux animaux supérieurs comme les primates (*Favre et al.*, 2002, *Latta-Mahieu et al.*, 2002). Des améliorations indispensables de ces systèmes sont donc nécessaires pour pouvoir envisager des applications cliniques. Une alternative a été de développer des systèmes de régulation basés sur des éléments endogènes a priori non immunogènes.

## **b. Systèmes existants basés sur des éléments endogènes**

Les systèmes de régulation endogènes de l'expression génique reposent sur des éléments de réponse endogènes (promoteurs, séquences activatrices de transcription («enhancers ») et qui répondent à des changements physiologiques ou des environnements exogènes (*Yew.*, 2005).

### **i. Systèmes de régulation basés sur l'hypoxie**

L'hypoxie est caractéristique de plusieurs maladies comme l'anémie, les cancers, les maladies inflammatoires et les rétinopathies. Dans une cellule normale en condition hypoxique, certains gènes sont sur exprimés, on peut citer l'EPO, le VEGF, l'IGF2, la tyrosine hydroxylase, certaines enzymes de la glycolyse : phosphoglycérate kinase (PGK), ou encore le transporteur de glucose GLUT. Tous ces gènes contiennent un ou plusieurs copies de l'éléments de réponse (HRE) dans leur région promotrice capables de recruter, en conditions hypoxiques, un hétérodimère HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) formé de deux sous unités HIF1 $\alpha$  et HIF1 $\beta$ . En conditions normoxiques, la sous-unité HIF1 $\alpha$  est hydroxylée et dégradée rapidement par le complexe ubiquitine-protéasome. En revanche, en conditions hypoxiques, l'hétérodimère HIF1 actif formé se lie sur les éléments HRE dans les régions promotrices des gènes inductibles pour en activer la transcription .

Plusieurs modifications ont été apportées à ce système au niveau des séquences HRE pour en améliorer l'efficacité et plusieurs versions sont utilisées *in vitro* et *in vivo* pour diverses applications (*Boast et al.*, 1999). Une approche de régulation fine par l'hypoxie consistant à adjoindre au gène de l'EPO un promoteur inductible par l'hypoxie tissulaire a été utilisée *in vivo* pour le traitement de

l'anémie. Une étude réalisée par Binley et al., a montré l'intérêt d'utiliser ce système de régulation pour le transfert du gène de l'EPO à l'aide d'un AAV dans un modèle murin déficient en EPO (Binley et al., 2002). Après injection intramusculaire, les auteurs ont observé une correction du phénotype anémique des souris sans mise en place d'une polyglobulie (observée après transfert du gène de l'EPO sous la dépendance du promoteur constitutif CMV).

L'hypoxie est également une caractéristique majeure du développement tumoral et plusieurs études ont employées des systèmes de régulation semblables basés sur l'hypoxie pour cibler l'expression génique au niveau tumoral (Dachs et al., 1997, Binley et al., 1999, Payen et al., 2001b, Binley et al., 2003). Ce type de système de régulation HRE est également envisagé pour réguler l'expression de gènes codant des protéines angiogéniques dans la rétine lors de problèmes de néovascularisation (Bainbridge et al., 2003) ou dans le myocarde ischémique (Prentice et al., 1997).

## ii. Systèmes de régulation basés sur l'hyperthermie

Une hyperthermie modérée (39-43°C) peut également permettre la régulation de l'expression d'un transgène notamment lorsqu'elle est combinée à un protocole d'irradiation dans un contexte de thérapie génique pour le traitement de cancers.

Le promoteur HSP70 (Heat Shock Protein70) contient des sites de fixation pour le facteur HSF1 (Heat Shock Factor 1). Ce dernier existe normalement dans la cellule à l'état de monomère, mais suite à un choc thermique forme un trimère capable de se fixer sur les éléments HSF1 du promoteur HSP70 pour activer la transcription.

Des vecteurs adénovirus construits avec le promoteur humain HSP70 contrôlant l'expression de gènes rapporteurs ou des gènes d'intérêt thérapeutique codant des cytokines à activité tumorale comme le TNF- $\alpha$  humain ou l'interleukine-12 ont été testés dans des lignées cellulaires tumorales (Brade et al., 2000, Huang et al., 2000, Borrelli et al., 2001). Des constructions similaires ont été testées *in vivo* avec un système de transfert de gène non viral (Xu et al., 2004).

L'avantage majeur d'utiliser ce système est le fait que les protéines HSP sont souvent sur-exprimées dans les cellules tumorales. Cependant, la difficulté réside dans le fait qu'il faut limiter la partie du corps à chauffer avec une température suffisante. De plus, il faut être en mesure de limiter les interférences avec des épisodes de fièvre ou d'inflammation (Huang et al., 2000).

## iii. Systèmes de régulation basés sur la glycémie

Les promoteurs répondant aux variations de concentration en glucose ont été évalués pour contrôler l'expression de l'insuline dans le cadre de diabète de type I. Une sur-expression d'insuline peut engendrer des effets délétères comme une hypoglycémie fatale, c'est pourquoi il est intéressant de développer un système de régulation d'insuline basé sur une expression de la protéine en réponse à des fortes concentrations de glucose sanguin et un arrêt de l'expression en réponse à des diminutions de la concentration en glucose. Pour cela, il a été développé différentes constructions virales contenant

différents promoteurs sensibles au glucose, comme le promoteur de la pyruvate kinase de type L, le promoteur PEPCK, le promoteur de la glucose-6-phosphatase, ou encore des promoteurs chimériques pyruvate kinase/IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein 1). De tels vecteurs ont été évalués pour normaliser les taux de glycémie chez des rats diabétiques traités à la streptozotocine (*Lee et al., 2000, Thulé et Liu., 2000, Chen et al., 2001*).

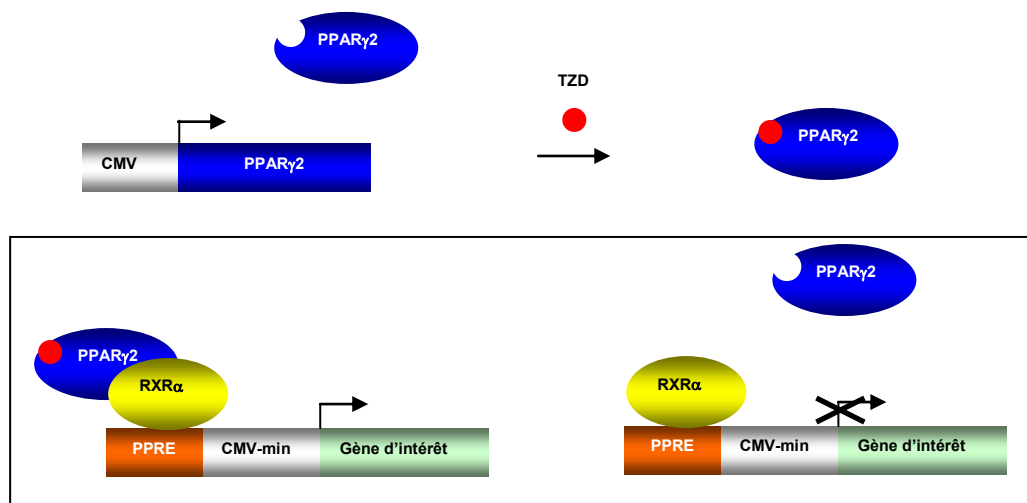
#### **iv. Systèmes de régulation basés sur le champ électrique**

Il s'agit d'un concept de régulation intéressant qui permet de réguler l'expression du transgène par la technique de transfert de gènes elle-même. Rubenstrunk et al., ont identifié un gène sur exprimé après administration d'impulsions électriques (8 impulsions de 200 V/cm avec une fréquence de 2Hz) chez la souris, il s'agit du gène de la metallothionéine-I (*Rubenstrunk et al., 2003*). Cette équipe a montré l'intérêt d'utiliser le promoteur de la metallothionéine pour réguler l'expression d'un transgène pendant une vingtaine de jours après injection intramusculaire du transgène, il a en effet été démontré que cette régulation était transitoire et ne permettait pas de réguler l'expression d'un gène au long terme. Une seconde étude menée deux ans plus tard par cette équipe a permis d'identifier la séquence minimale du promoteur murin de la metallothionéine-I sensible au stimulus champ électrique (*Rubenstrunk et al., 2005*). Mais aucune amélioration du système n'a été développée pour satisfaire l'efficacité d'une régulation à long terme compatible avec une utilisation dans un contexte de thérapie génique.

#### **v. Systèmes de régulation basés sur les récepteurs PPAR $\gamma$**

Ce système original repose sur l'activation d'un facteur de transcription, le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ 2 (peroxysome proliferator-activated receptor) par des ligands synthétiques utilisés pour le traitement du diabète, les thiazolidinediones (TZD). Naturellement, ces récepteurs nucléaires, exprimés dans le tissu adipeux, sont activés par les acides gras insaturés et les dérivés de la prostaglandine. Ils sont responsables de l'homéostasie lipidique et glucidique. Les TZD activent une série d'événements transcriptionnels via le récepteur hétérodimérique formé du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ 2 et du récepteur alpha au rétinoïde X RXR endogène. Ce complexe hétérodimérique activé se lie à des séquences spécifiques PPREs (PPAR response element) situées en amont du promoteur basal (Figure 20).





**Figure 20-Schéma du système inductible par les thiazolidinediones.**

Les premiers travaux réalisés chez la souris et le rat ont montré l'efficacité de ce système pour réguler l'expression génique dans le myocarde et le muscle squelettique (*Darteil et al., 2002*). Mais la limite de ce système repose sur l'expression ectopique des récepteurs PPAR $\gamma$ 2 dans le muscle cardiaque ou squelettique modifiant la transcription de gènes endogènes (impliqués dans la différenciation myogénique). Une version plus récente et plus stringente de ce modèle a été validée *in vitro* en insérant des mutations ponctuelles modifiant la spécificité du facteur de transcription pour ses sites de liaison PPREs (*Tascou et al., 2004*).

D'autres systèmes qui répondent à des changements physiologiques ou environnementaux exogènes tels que l'inflammation (*Varley et al., 1997*), les métaux lourds (*Mayo et al., 1982*), le champ électromagnétique (*Lin et al., 2001*), ou encore les radiations ionisantes (*Hallahan et al., 1995*) ont été développés.

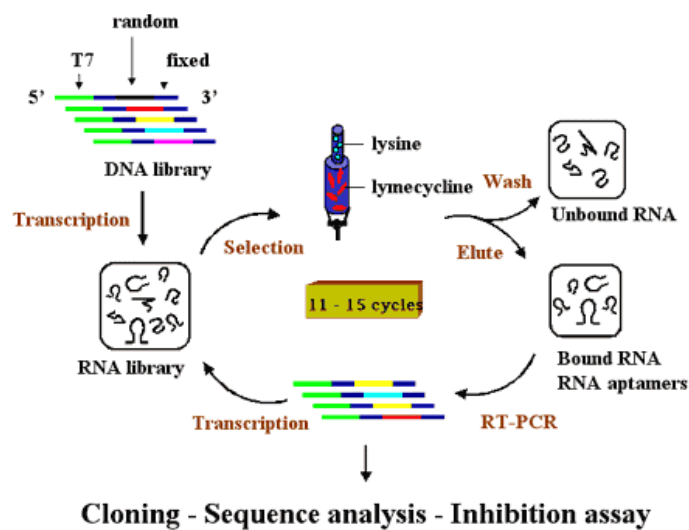
Bien qu'à priori non immunogènes, ces systèmes présentent cependant un risque d'interférence avec les réseaux endogènes de régulation des cellules cibles, répondant aux mêmes inducteurs. Ces phénomènes pleiotropiques peuvent conduire à des effets secondaires non contrôlés (*Fussenegger et al., 2001*). Notons enfin, qu'il existe également dans la littérature des systèmes de régulation hybrides basés à la fois sur des systèmes de régulation endogène et exogène (*Vilaboa et al., 2005*).

## 6.2. Régulation au niveau post-transcriptionnel

### a. Régulation de la stabilité de l'ARN

Fondées sur le rôle pivot de la molécule d'ARN messager dans les processus cellulaires qui conduisent à l'expression des protéines, des stratégies de régulation traductionnelle ont été développées pour réguler la molécule d'ARN messager elle-même. Une stratégie innovante consiste à sélectionner *in vitro* des ARNs capables de lier des protéines ou des oligonucléotides et de former des structures stables en présence d'une drogue. Ces ARNs, appelés *aptamères* (Patel *et al.*, 1999) possèdent une forte affinité et une forte spécificité pour leur ligand. Ces ligands sont souvent des petites molécules de type cofacteur (ATP, FMN, ...), oligonucléotides, acides aminés (arginine, citrulline) ou bien de plus grosses molécules comme les peptides. La fixation du ligand induit un changement de conformation de l'ARN qui établit de nombreuses interactions, par liaisons hydrogène et empilements (Uhlenbeck *et al.*, 1997). Ces aptamères incorporés dans la région 5' non traduite, agissent *in vivo* comme régulateurs conditionnels de l'expression du gène.

Des aptamères d'affinité pour la tétracycline, ont été isolés par la méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (Toulmé *et Giegé* 1998) à partir d'une population complexe d'ARN synthétique et testés *in vivo* pour inhiber de façon tétracycline dépendante l'expression du gène codant la luciférase (Le Bec *et al.*, 1999) (Figure 21).

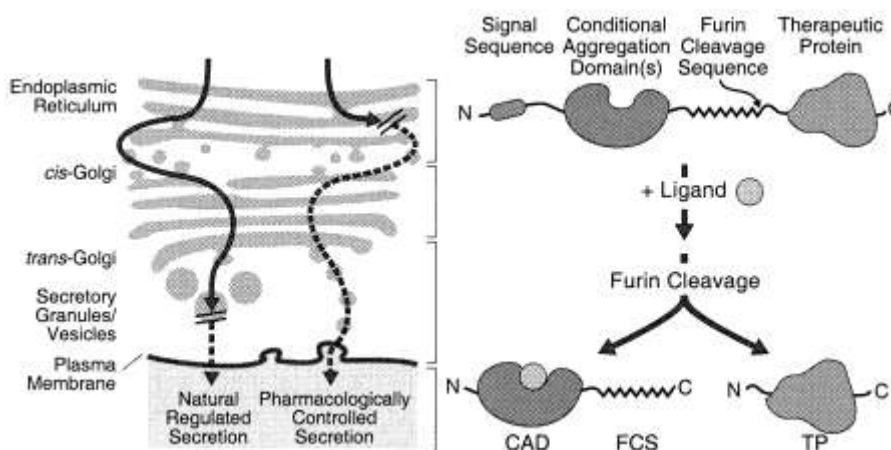


**Figure 21-Schéma de la méthode SELEX.**

Tout d'abord une banque d'ADN est constituée à partir d'oligonucléotides dans lesquels une séquence plus ou moins dégénérée est flanquée de régions fixes contenant les signaux nécessaires à sa multiplication par des polymérase. Cette population est transcrite en une bibliothèque d'ARN simple brin par une ARN polymérase. Ensuite, les oligoribonucléotides répondant aux critères de tri sont isolés avant d'être convertis en ADN simple brin et amplifiés par transcription inverse (RT-PCR). Les séquences sélectionnées sont alors clonées et séquencées. Cette succession d'étape est répétée afin d'obtenir une bibliothèque restreinte contenant des séquences adaptamères. D'après Le Bec *et al.*, 1999.

## b. Régulation par modifications traductionnelles de la protéine

La libération efficace d'une protéine en utilisant la thérapie génique doit mimer la cinétique d'expression naturelle. Les systèmes de régulation de la transcription permettent une activation/désactivation sur un intervalle de temps de l'ordre de la journée au minimum (*Clackson T., 2000*). Ce qui peut parfaitement être adapté pour certaines protéines telle que l'EPO par exemple, qui régule la croissance et la différenciation cellulaire, ne l'est pas pour des protéines qui sont physiologiquement sécrétées ponctuellement ou de façon pulsatile, comme l'hormone de croissance ou l'insuline sécrétée sur une période post-prandiale brève d'environ 4 heures. Il est alors possible de réguler la traduction (*Werstuck et Green., 1998*) ou la sécrétion elle-même. Une libération pulsatile d'insuline a été reproduite chez des souris *nude* hyperglycémiques après implantation de cellules génétiquement modifiées (*Rivera et al., 2000*). Dans ce système, l'insuline est synthétisée de manière constitutive avec un domaine d'agrégation conditionnelle (CAD), dérivé de la protéine FKBP12 par échange d'un acide aminé et avec une séquence de clivage à la furine (Figure 22). En absence de ligand, les protéines fusionnées s'agrègent entre elles par l'intermédiaire de leur CAD. Trop volumineuses pour être exportées, elles s'accumulent dans le réticulum endoplasmique. Lorsque le ligand se lie au CAD, les protéines sont libérées, la furine présente naturellement dans l'appareil de golgi permet l'obtention de la protéine d'intérêt. Le système se caractérise par un niveau basal de sécrétion extrêmement faible, une réponse proportionnelle à la concentration du ligand et une cinétique rapide (l'insuline est détectée dans le plasma 15 minutes après administration du ligand et le pic de concentration, 2 heures après). Reste à montrer la capacité de ce système à fonctionner après avoir été délivré par un vecteur utilisé pour le transfert de gène direct *in vivo*.



**Figure 22-Schéma du système de régulation de la sécrétion de protéines contrôlée par l'agrégation dans le réticulum endoplasmique .**

Modifié d'après *Rivera et al., 2000*. Science.

# Matériels et Méthodes

---

## 1. Matériels

### Plasmides

- **Le plasmide pCMV-luc** (6233 pb) code la luciférase sous la dépendance du promoteur du cytomégalovirus CMV-IE
- **Le plasmide pCMV-GFP** (4731 pb) code la green fluorescent protein GFP sous la dépendance du promoteur du cytomégalovirus CMV-IE
- **Le plasmide pGT14860** (16111 pb) code la mini-dystrophine murine tronquée au niveau des exons 13 à 49 ( $\Delta$ 13-49). Ce gène est sous la dépendance du promoteur du cytomégalovirus CMV-IE. L'intron de la 3-hydroxy-3-méthylgluaryl-CoA reductase murine (HMGCR) se situe en amont du gène de la mini dystrophine, celui ci permet une expression constitutive et ubiquitaire du gène codant la mini-dystrophine. Le plasmide contient le signal de polyadénylation pA du virus SV40.
- **Les plasmides pVR-SeAP et pvt-20** contiennent respectivement le gène de la phosphatase alcaline sécrétée humaine (hSeAP) ou murine (muSeAP) sous le contrôle du promoteur cytomégalovirus CMV-IE1 et du signal polyA de l'hormone de croissance bovine. Ces plasmides nous ont été fournis par le DR. V THUILLIER (Centelion, Vitry sur Seine, France). Le gène rapporteur SeAP code l'enzyme placentaire délétée de son domaine d'ancrage à la membrane. La SeAP sécrétée possède également la caractéristique d'être résistante à la chaleur. L'activité de la phosphatase alcaline endogène peut-être ainsi éliminée par un pré-traitement des échantillons à 65°C pendant 5 minutes.
- **Le plasmide pTet-o-mEPO**  
Ce plasmide code l'EPO murine sous la dépendance du facteur de transcription chimérique rtTA2<sup>S</sup>-M2 dont l'activité est régulée par un antibiotique, la tétracycline ou son analogue, la doxycycline.  
La cassette d'expression contenant le facteur de transcription et le gène de l'EPO murine est extraite par digestion enzymatique (MscI) à partir d'un ADNc provenant de l'AAV SSV9-mET-CAG-M2-pA (FOR) gracieusement fourni par Philippe Moullier et Pierre CHENUAUD (Laboratoire de Thérapie Génique, Nantes, France). Le fragment obtenu est inséré dans le vecteur pCDNA3 (site de clonage ECORV).

Afin de juger facilement du niveau de fuite, le gène codant rtTA2<sup>S</sup>-M2 est sous le contrôle d'un promoteur fort CAG (Niwa *et al.*, 1991), fusion du promoteur de la  $\beta$ -actin de poulet et de l'enhancer du promoteur précoce du CMV. Ce transactivateur rtTA2<sup>S</sup>-M2 est composé d'une version mutée du répresseur tetR (rtetR) de l'opéron *Tn-10* de résistance à la tétracycline d'*Escherichia coli* et des domaines minimaux d'activation de la protéine VP-16 de l'HSV. Le signal polyA du gène codant l'EPOm provient de l'hormone de croissance bovine BGH (Bovine Growth Hormone). Une séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element) est située en 3' de l'ADNc de l'érythropoïétine. Celle-ci permet d'augmenter l'expression du transgène (Donello *et al.*, 1998) en agissant en cis par stabilisation des ARNm de l'érythropoïétine. Elle permet de doubler la demi-vie des ARNm (Zufferey *et al.*, 1999) et une bonne expression du transgène *in vitro* (Loeb *et al.*, 1999) (Zufferey *et al.*, 1999).

- **Le plasmide pCMV-mEPOreverse** est construit à partir du plasmide pTet-o-mEPO. Il contient le gène codant l'EPO murine sous le contrôle du promoteur fort du cytomegalovirus (CMV)IE1. Ce plasmide est utilisé tant que contrôle négatif avec une séquence cDNA de l'EPO murine inversée par rapport au promoteur. Pour construire ce plasmide, nous avons amplifié le cDNA codant l'EPO murine à partir du plasmide pTet-O-mEPO en utilisant des primers spécifiques de l'EPO murine (F-EPO-m-XbaI : 5' ACTCTAGAATGGGGGTGCCCGAA 3', R-EPO-BamHI : 5' CAGGATCCTCACCTGTCCCCTC 3'). Les produits de PCR ainsi obtenus sont clonés dans un vecteur Topo<sup>®</sup>Cloning (Invitrogen Life Technologies) et ensuite extraits avec les enzymes de restriction XbaI et BamHI. Enfin, ces fragments sont insérés dans un plasmide pcDNA-3 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

- **Le plasmide pCMV-mEPO** est construit à partir du plasmide pCMV-mEPOreverse. Il contient le gène de l'EPO murine sous la dépendance du promoteur fort du cytomegalovirus (CMV)IE1. Pour obtenir ce plasmide, nous avons sorti l'insert codant l'EPO murine du plasmide pCMV-mEPOreverse grâce à l'enzyme PmeI et cloné celui-ci dans un vecteur pcDNA-3 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Tous les plasmides sont amplifiés en système bactérien (*Escherichia coli* recombinantes (XL1)) et purifiés à l'aide de colonnes endotoxines free (Quiagen, Courtabouef, France). L'utilisation du kit Quiagen endotoxines free permet de limiter les réactions immunitaires lors de l'injection des plasmides dans le muscle des souris.

## "small interfering" ARN (siRNA) anti-EPO

Le siRNA dirigés contre l'érythropoïétine murine proviennent de la société Tebu-bio (Santa Cruz Biotechnologies, Le Perray en Yvelines, France) et sont conservés en solution aqueuse "RNase Free" à 50  $\mu$ M. La séquence de ces nucléotides ne nous a pas été fournie.

## Lignée cellulaire

- **Les cellules DaE-7** nous ont été gracieusement fournies par le professeur P.Moullier (laboratoire de thérapie génique, Nantes). Ce sont des cellules non adhérentes, issues d'une lignée hématopoïétique dépendante de l'érythropoïétine (*Sakaguchi et al., 1987*) qui se cultivent à 37°C sous atmosphère humide et contrôlée (5% CO<sub>2</sub>), dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% du mélange pénicilline/streptomycine, et supplémenté à 15 U/ml d'érythropoïétine recombinante (Neorecormon<sup>®</sup>, Roche Diagnostic, Meylan, France).

## Animaux

Les souris utilisées sont des femelles de souche Swiss, Nude-Swiss, ou C57Bl/6J âgées de 8 semaines provenant de l'élevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Les souris utilisées pour les études de transfert du gène codant la mini-dystrophine sont des souris saines ou *mdx* mâles âgées de 8 semaines de souche C57bl/10 (Elevage Charles River, L'Arbresle, France).

Les souris sont conditionnées après acclimatation en module. Au moins 5 souris sont incluses par groupe expérimental.

## Préparation des formulations

Nous avons utilisé deux types de copolymères à blocs pour réaliser les études de transfert de gène *in vivo*.

### les poloxamères

Ce sont des composés amphiphiles non ioniques constitués de motifs poly(éthylénoxyde)<sub>x</sub>-poly(propylénoxyde)<sub>y</sub>-poly(éthylénoxyde)<sub>x</sub>.

Avec x = 75 et 30 respectivement pour le poloxamère P188 (Pluronic F68, Lutrol) et le poloxamère 184 (Pluronic L64, PE6400), et y = 30 pour les deux poloxamères.

### les poloxamines

Ce sont des composés tétra fonctionnalisés amphiphiles légèrement cationiques constitués de motifs [poly(éthylénoxyde)<sub>x</sub>-poly(propylénoxyde)<sub>y</sub>]<sub>2</sub>-[éthylène diamine (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N)]- [poly(éthylénoxyde)<sub>x</sub>-poly(propylénoxyde)<sub>y</sub>]<sub>2</sub>. Pour le poloxamine 304, x et y sont chacun égal à 4.

Tous les copolymères à blocs proviennent de BASF (Mount Olive, NJ). Les solutions stocks sont préparées à 20% (W/V) dans de l'eau injectable (eau PPI) et conservées à 4°C.

Les formulations copolymères/ADN sont préparées par mélange équivolumentrique de copolymères à la concentration désirée avec la solution d'ADN plasmidique à la concentration désirée (en absence ou en présence de siRNAs) diluée dans une solution de Tyrode 2X. Ces mélanges sont réalisés à température ambiante 10 minutes avant l'injection intramusculaire. La quantité d'ADN indiquée correspond à la quantité totale d'ADN injectée dans un volume constant de 50 µl par muscle. Ainsi la même quantité de copolymères à blocs est injectée pour un pourcentage donné.

## 2. Méthodes

### Animaux et traitements

#### a. Transfert de gènes dans le muscle squelettique *in vivo*

Les souris sont anesthésiées par injection intra péritonéale d'étomidate (hypnomidate®, 40 mg/kg). Après avoir rasé les pattes postérieures de l'animal, les tibiaux antérieurs droit et gauche de la souris sont injectés, en un seul site, avec 50 µl de solution contenant la formulation ADN/polymère, à l'aide d'une seringue à insuline de 0,5 ml (U/1008x0,30mm SRB/30 nmedical) (Issy les moulineaux, France). Au moins 10 muscles sont inclus pour l'analyse de chaque groupe expérimental.

#### b. Traitement à l'adénine

L'insuffisance rénale chronique chez les souris est induite par un traitement chimique avec l'adénine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). L'adénine est mélangée à raison de 0.25% dans la poudre alimentaire (Safe, Augy, France).

#### c. Traitement à la doxycycline

Après injection intramusculaire, les souris reçoivent la doxycycline (Ronaxan P.S. 5%® MERIAL, France) dissout dans l'eau de boisson à une concentration finale de 200 µg/ml dans 5 % de sucrose. Les biberons sont conservés à l'abri de la lumière et changés tous les deux jours.

#### d. Immunosuppression

Pour les tests immunosuppresseurs, les souris sont traitées avec la cyclosporine A (Neoral®, Novartis, Rueil-Malmaison, France) par voie orale à raison de 10 mg/kg/jour pendant toute la durée de l'expérimentation.

#### e. Prélèvements de sang

Les échantillons de sang sont prélevés chez la souris vigile par ponction rétro-orbitale à l'aide d'une pipette pasteur pour le sérum ou d'un capillaire hépariné (VWR, France) pour le plasma.

#### **Préparation du sérum**

Après coagulation du sang total à 37°C, les échantillons sont centrifugés à température ambiante pendant 3 minutes à 1000g puis les sérums sont prélevés et conservés à -80°C jusqu'au dosage.

#### **Préparation du plasma**

Les échantillons de sang total sont directement centrifugés à température ambiante pendant 3 minutes à 1000g puis les plasmas sont prélevés et conservés à -80°C jusqu'au dosage.

### **f. Prélèvements d'organes**

Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale et les organes sont prélevés et conservés de façon appropriée selon l'analyse réalisée (voir ci-dessous).

### **Analyse de l'expression des gènes**

#### **a. Dosage des gènes rapporteurs**

##### **• Dosage de la luciférase par chimioluminescence**

Chaque muscle disséqué est broyé à l'Ultra-Thurax dans 1ml de tampon de lyse RLB (Reporter Lysis Buffer, Promega) supplémenté avec un cocktail d'anti-protéases (Roche Diagnostic, France). Le broyat est alors centrifugé pendant 10 minutes à 10000 rpm et à 4°C, et l'activité luciférase de l'échantillon (Luciferase assay system, Promega) est mesurée par luminométrie à partir de 10µl de surnageant à l'aide d'un luminomètre (Victor<sup>2</sup> Perkin Elmer, Norwalk, MA). Une gamme étalon est réalisée par dilution d'une solution stock de luciférase.

##### **• Détection de la GFP par microscopie optique**

Après dissection, les muscles sont cryoprotégés 2 heures dans un bain de paraformaldéhyde à 4% dans le PBS (Phosphate Buffer Saline, Sigma), sont rincés 3 fois 10 minutes dans du PBS et sont baignés 3 fois 1 heure à 4°C dans du saccharose à 20%. Les muscles sont alors inclus dans du Tissue-Tek® (Sakura Finetek, USA, Torrance, CA) et congelés dans l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Les échantillons ainsi congelés sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation ultérieure au cryostat. Les coupes de biopsies sont réalisées au cryostat (10µm) et sont apposées sur lame. L'observation des lames est réalisée au microscope à fluorescence (Carl Zeiss).

##### **• Dosage de la phosphatase alcaline par chimioluminescence**

L'activité de la phosphatase alcaline plasmatique est détectée grâce au kit Phosphalight (Tropix Perkin-Elmer, MA) en suivant quelques modifications selon Wang *et al.*, 2001. les échantillons de plasma (15 µl) sont ajoutés aux 45 µl de tampon de dilution 1X préalablement déposés (50mM Tris-



HCl (pH7.4), 150mM NaCl). Après une étape de chauffage à 65°C pendant 5 minutes, 50 µl d'échantillons dilués sont incubés avec 50 µl d'Assay buffer (2M diethanolamine (pH10.5-11), 1mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM L-homoarginine) pendant 5 minutes à température ambiante. Enfin on ajoute 50 µl de Reaction buffer (substrat CSPD dilué au 1/20 avec l'enhancer Emerald fournis dans le kit). Après une incubation de 20 minutes à température ambiante, nous mesurons la luminométrie (10 secondes par puits) à l'aide d'un luminomètre (Victor<sup>2</sup>, Perkin Elmer, Norwalk, MA).

## **b. Dosage des gènes d'intérêt thérapeutique**

### **• Immuno-détection de la dystrophine**

Après dissection, les muscles sont inclus dans du Tissue-Tek® (Sakura Finetek, USA, Torrance, CA) et congelés dans l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Les échantillons ainsi congelés sont conservés à -80°C. Des sections transversales de 10 µm d'épaisseur sont obtenues par coupe au cryostat et sont apposées sur lame. Les lames portant les coupes sont baignées 1 heure à température ambiante dans du Triton X-100 à 1% dans le PBS afin d'éliminer les protéines libres intercellulaires. Pour atténuer le bruit de fond dû à la biotine endogène des muscles, chaque lame est traitée avec 200µl de système de blocage de la biotine (Biotin blocking system, Dako Cytomation).

La dystrophine est détectée par immunomarquage à l'aide des anticorps primaires murins anti-dystrophine murine (DYS1 et DYS2 dilués au 1/20 dans du PBS, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK). La mini-dystrophine et la dystrophine entière murines sont mises en évidence par l'anticorps primaire DYS2 dirigé contre le domaine C-terminal de la protéine (exon 79), alors que seule la dystrophine entière est détectée par l'anticorps DYS1 spécifique du domaine central (correspondant aux exons 25 à 28) de la dystrophine, ce domaine étant absent de la mini dystrophine.

Avant les incubations avec les anticorps primaires, de façon à bloquer les immunoglobulines endogènes de souris, on réalise préalablement un bain avec un anticorps de chèvre anti-souris non couplé à la biotine (Dako Cytomation) dilué au 1/100. Puis les coupes sont mises à incuber pendant une nuit en chambre humide à 4°C avec l'anticorps primaire dilué selon les recommandations du fournisseur en PBS-BSA 2% (albumine bovine sérique).

Les anticorps primaires sont détectés par des immunoglobulines de chèvre anti-souris couplées à la biotine (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Ces anticorps secondaires liés à la biotine sont dilués au 1/200 en PBS-BSA 2% et incubés pendant 1 heure à température ambiante. Enfin, la visualisation de la dystrophine est rendue possible par la streptavidine-FITC (Fluoresceïn Isothiocyanate) diluée au 1/50 en PBS-BSA 2% incubée pendant 2 heures.

Entre chaque étape les lames sont rincées 3 fois 10 minutes avec du PBS. Après le dernier rinçage, les lames sont montées en Vectashield et observées au microscope à fluorescence (Carl Zeiss).

La restauration du complexe dystroglycoprotéique est attestée par l'immunomarquage avec les anticorps primaires anti-  $\alpha$ -sarcoglycane ( $\alpha$ -SARC) (NCL- $\alpha$ -SARC, Novocastra) dilué au 1/100 et

anti- $\beta$ -dystroglycane ( $\beta$ -DG) (NCL- $\beta$ -DG, Novocastra) dilué au 1/50. Les lames sont alors observées au microscope à fluorescence (Carl Zeiss).

• **Mesure du taux d'hématocrite des souris, dosage et immuno-détection de l'érythropoïétine.**

**Mesure du taux d'hématocrite**

L'hématocrite des souris est mesuré tous les 7 jours, par saignée rétro-orbitale à l'aide de micro-capillaires héparinés (Bayer Diagnostic). Grâce à une microcentrifugeuse graduée, l'hématocrite est directement lu en pourcentage.

**Dosage de l'érythropoïétine sérique**

Le dosage de l'EPO sérique est réalisé à l'aide d'un kit ELISA (Medac, Hamburg, Germany). Brièvement, l'EPO murine est détectée à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre 2 parties différentes de la protéine (méthode "sandwich"). Pour chaque mesure, 25µl de l'échantillon dilué dans un tampon de dilution sont déposés dans un puits, au fond duquel est fixé le premier anticorps reconnaissant l'Epo de souris. Les plaques sont mises en incubation pendant 1 heure à 37°C. La solution du deuxième anticorps couplé à la phosphatase alcaline est déposée dans chaque puits et incubée à température ambiante pendant une heure.

Entre chaque étape les puits sont rincés 3 fois 1 minute avec 300 µl de la solution de lavage.

La solution de substrat est ajoutée et incubée 30 minutes à température ambiante en chambre humide et à l'obscurité. L'activité de la phosphatase alcaline de l'anticorps fixé modifie le substrat p-nitrophenylphosphate en une solution p-nitrophenol jaune vif. La réaction est enfin stoppée en ajoutant une solution d'hydroxyde de sodium 3N.

La densité optique de la solution contenue dans les puits est alors mesurée à 405nm. A chaque valeur obtenue est retranchée la valeur moyenne des zéros chromogéniques. La quantité d'EPO des échantillons est déterminée grâce à une gamme étalon réalisée avec des quantités connues d'Epo recombinante. Chaque échantillon est mesuré en duplicate. La fenêtre de détection se situe entre 1,25 et 160 mIU/ml. Chez l'homme, les taux plasmatiques moyens sont de 5 à 30 UI /ml quels que soit l'âge, et le sexe.

**Immuno-détection de l'EPO**

Les muscles des souris injectées sont disséqués et inclus dans le Tissue-Teck<sup>®</sup> (Sakura Finetek, USA, Torrance, CA) avant d'être plongés dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide. Des sections de 8 µm d'épaisseur sont obtenues, fixées avec le paraformaldéhyde à 4% pendant 10 minutes et colorées avec une solution d'hématoxyline-éosine.

Pour l'immuno-détection de l'EPO musculaire, les sections sont perméabilisées avec une solution de PBS-Triton à 0.1% pendant 30 minutes. Après 3 séries de rinçage au PBS 1%, les lames sont incubées avec un anticorps primaire de chèvre dirigé contre l'EPO humaine (SantaCruz Technology, Tebubio, Le Perray en Yvelines, France), et sont ensuite incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'HRP (HorseRadish Peroxydase) (SantaCruz Technology, Tebubio, Le Perray en Yvelines, France). Les

anticorps liés sont enfin révélés en utilisant un substrat chromogène, Dakocytomation liquid DAB substrate Chromogen System (Dakocytomation, Trappes, France). Les lames sont visualisées grâce à un microscope Zeiss AxioVision.

### **Extraction ARNtotal et RT-PCR (reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction)**

Les muscles de souris sont disséqués et immédiatement broyés dans le TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Ce réactif permet d'isoler les ARN totaux (ARNt). Après centrifugation à 12000 rpm et à 4 °C pendant 10 minutes, les échantillons subissent ensuite un traitement à la DNaseI (RNeasy<sup>®</sup> mini Kit -Qiagen, Chatsworth, CA, USA). L'ADN complémentaire (ADNc) simple brin est synthétisé grâce au système SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Enfin, les ADNc sont amplifiés par Polymerase Chain Reaction (PCR) à l'aide d'amorces spécifiques, décrites ci après : mEPO, 5'-TCACTTCACTGCTTCGGGTA-3' (forward), 5'-CCTCTCCCGTGTACAGCTTC-3' (reverse) et glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), 5'-CTGTGCCGTTGAATTTGCC-3' (forward), 5'-GTCGGTGTGAACGGATTTGG-3' (reverse). Les amorces utilisées ont été sélectionnées afin d'entourer les séquences introniques, nous permettant ainsi de visualiser une éventuelle contamination par l'ADN génomique.

Les amorces spécifiques de l'EPO murine sélectionnées s'hybrident avec les exons 3 et 4 du transgène et permettent l'amplification d'un fragment de 165 pb dans le plasmide et de 905 pb dans l'ADN génomique. Les amorces spécifiques de la G3PDH permettent l'amplification d'un fragment de 234 pb dans l'ADN génomique.

Les PCR sont réalisées dans un volume final de 30 µl comprenant 500 ng d'ADN, la Taq DNA polymérase, des dNTPs, du MgCl<sub>2</sub> et les couples d'amorces. La réaction comprend une étape de dénaturation de 3 min à 94°C, puis une amplification de 30 cycles (30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'appariement à 55°C, 1 min d'élongation à 72°C), et enfin une extension finale de 10 min à 72°C (GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700, Applied Biosystems). Les produits de PCR sont ensuite soumis à une électrophorèse dans un gel à 2% en agarose et l'ADN est révélé par exposition aux UV.

### **Dosage de l'Interleukine 6 (IL-6)**

Les muscles sont prélevés, plongés dans l'azote liquide et broyés dans 1 ml de RLB (Reporter Lysis Buffer, Promega) supplémenté avec un cocktail d'anti-protéases (Roche Diagnostic, France). Le broyat est centrifugé pendant 10 minutes à 10000 rpm et à 4°C. Le dosage de l'IL-6 musculaire est déterminée dans le surnageant grâce à l'utilisation d'un kit ELISA utilisé selon les instructions du fournisseur (R&D Systems, Minneapolis, USA). Une gamme étalon est incluse dans chaque plaque de dosage.

### **Analyses histochimiques**

Les muscles des souris injectées sont disséqués et inclus dans le Tissue-Teck<sup>®</sup> (Sakura Finetek, USA, Torrance, CA) avant d'être plongés dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide. Des sections de 8 µm d'épaisseur sont obtenues, fixées avec le paraformaldéhyde à 4% pendant 10 minutes, colorées avec une solution contenant l'hématoxyline et l'éosine et observées par microscopie optique (Zeiss AxioVision.).

Les analyses histologiques des reins ont été réalisées par les Dr. Emmanuel Payen, Anne Janin et Stephanie Belhadj (Saint-Louis Hospital, Paris, France). Les reins sont fixés dans une solution contenant un mélange d'alcool, de formalin et d'acide acétique, puis inclus en paraffine. Les sections (2 µm d'épaisseur) sont colorées par l'hématoxyline et l'éosine. L'observation et l'analyse histologiques des lames sont réalisées grâce à un microscope Olympus AX70 et à un logiciel analysant la couleur.

### **Détermination du pourcentage de réticulocytes circulants**

Les échantillons de sang total sont rincés avec du PBS 1X froid et centrifugés pendant 5 minutes à 3000 rpm et à 4°C. Les cellules sont ensuite incubées 45 minutes à 4°C avec du PBS contenant 0.1 ng/ml de thiazole orange (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Le pourcentage de réticulocytes est ensuite déterminé par cytométrie de flux (FACSCalibur -BD Biosciences, San Jose CA, USA) et en utilisant le logiciel d'analyse «CellQuestPro Software ».

### **Détection des anticorps dirigés contre l'EPO**

La présence d'anticorps dirigés contre l'EPO dans le sérum des souris anémiques est évaluée en utilisant un test de fonctionnalité. Cette expérience repose sur l'habileté des séra de souris anémiques à neutraliser l'EPO recombinante nécessaire à la croissance de cellules DaE-7. Les cellules DaE-7, subcultivées sont lavées deux fois et reprises dans un milieu DMEM contenant 10 % SVF et 1% du mélange pénicilline/streptomycine, sans érythropoïétine. Elles sont ensuiteensemencées à 10<sup>5</sup> cellules/ml dans des plaques 96 puits. Pour chaque échantillon sérique, une série de dilution (dilution de 2 en 2) est mise en présence des cellules DaE-7 extemporanémentensemencées. Au bout de 48 heures d'incubation à 37°C en atmosphère contrôlée à 5% CO<sub>2</sub>, nous réalisons un test de viabilité des cellules DaE-7. Le CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, est une méthode colorimétrique permettant de dénombrer quantitativement les cellules viables. De 1 à 4 heures après son addition, le composé MTS tétrazolium ou MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium) est réduit en formazan par les déshydrogénases des cellules vivantes. La quantité de formazan produit est mesurée par absorbance à 490 nm (avec une absorbance référence de 630 nm), et est directement proportionnelle au nombre de cellules DaE-7 viables.

### **Dosage plasmatique de l'urée et de la créatinine**

Les plasmas de souris sont dilués au  $\frac{1}{2}$ , et traités en duplicate. Les taux d'urée et de créatinine plasmatiques sont déterminés à l'aide du kit "CREA and UREA/BUN" (Roche Diagnostic Diagnostic). Ces mesures ont été réalisées au sein de l'hôpital Saint Louis à Paris (Pr. Yves Beuzard).

### **Western blot**

La protéine purifiée rtTA (fournie par le Professeur P. Mouiller, Laboratoire de Thérapie génique, Nantes) (240 ng) est dénaturée et mise à migrer dans un gel de polyacrylamide (15%)/SDS pendant 1 heure à 200mV et 40 ampères. La protéine est ensuite transférée sur une membrane de nitrocellulose (Hybon-C, Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK). Après saturation avec du PBS contenant 5% de lait, la membrane est incubée la nuit à 4°C avec soit du PBS contenant 0.2% de Tween 20 et 5% de lait, soit avec une dilution au  $1/4000^{\text{ième}}$  d'un anticorps de lapin dirigé contre la partie répresseur TetR, soit avec le sérum des souris dilué au  $1/100^{\text{ième}}$ . Les anticorps fixés à la protéine rtTA sont révélés en utilisant des anticorps de chèvre conjugués à la peroxydase dirigés contre les IgG de lapin ou de souris, et un kit de détection chimioluminescent ECL (Amersham Life Sciences).

### **Tests statistiques**

Les analyses statistiques sont effectuées avec le test paramétrique t de *Student* ou le test non paramétrique de Mann-Whiley.

# Résultats

---

## Chapitre 1

### ***Transfert du gène codant la mini-dystrophine à l'aide de copolymères à blocs chez la souris***

<b><i>mdx</i></b> .....	<b>88</b>
- Evaluation de l'efficacité du transfert de gène dans le muscle dystrophique .....	89
- Transfert de gène dans le muscle squelettique sain en régénérescence. ....	91
- Transfert du gène codant la mini-dystrophine chez la souris <i>mdx</i> .....	92
- Restauration des protéines du complexe DGC à la membrane des fibres après transfert de gène. ....	94

## Chapitre 2

### ***Sécrétion ectopique de protéines à partir du muscle squelettique après transfert de gène. .*** 96

- Transfert de gènes codant des protéines sécrétées à l'aide de copolymères à blocs dans le muscle squelettique.....	97
- Traitement de l'anémie acquise au cours de l'insuffisance rénale chronique chez la souris .....	99
- Sécrétion d'érythropoïétine après transfert de gène dans le muscle squelettique .....	99
• Anémie autoimmune après transfert du gène codant l'EPOm chez la souris Swiss immunocompétente. ....	103
• Absence d'anémie autoimmune après transfert de gène chez la souris Swiss.....	109
• Correction du phénotype anémique après transfert de gène codant l'EPOm dans un modèle de souris en IRC .....	111

## Chapitre 3

### ***Régulation de la sécrétion de protéines à partir du muscle squelettique après transfert de gène. ....*** 118

- Sécrétion inductible d'érythropoïétine après transfert de gène dans le muscle squelettique. ....	120
- Régulation de l'expression du transgène par la doxycycline après transfert de gène dans le muscle squelettique.....	123
- Réaction immunitaire contre le transactivateur rtTA2s-M2 .....	124

## Chapitre 1.

### Transfert du gène codant la mini-dystrophine à l'aide de copolymères à blocs chez la souris *mdx*.

Le transfert d'acides nucléiques pourrait représenter un outil puissant pour le futur traitement des dystrophies musculaires, comme la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Ces dernières années, de nombreux efforts ont été réalisés dans le domaine du transfert de gène non viral et ont permis d'aboutir aux premières applications cliniques visant à prouver l'innocuité de l'injection d'ADN nu dans le muscle squelettique de patients myopathes (*Romero et al., 2002, Romero et al., 2004*). En effet, l'injection intramusculaire d'ADN nu est une technique sûre pour amener une copie normale du gène de la dystrophine dans les cellules musculaires. Cependant, l'efficacité du transfert de gènes par injection direct dans le muscle squelettique est très faible. L'électrotransfert a été décrite comme une technique permettant d'augmenter l'efficacité de transfection par rapport à l'ADN nu chez la souris *mdx*, modèle murin de la DMD (*Vilquin et al., 2001*). Cependant, les dommages tissulaires engendrés par cette technique et la difficulté de procéder à son utilisation à grande échelle limitent ses capacités pour une utilisation clinique.

Une alternative consiste à utiliser de nouveaux vecteurs développés récemment pour le transfert de gènes dans les muscles squelettique et cardiaque (*Pitard et al., 2002, Pitard et al., 2004*). Il a en effet été démontré que les copolymères à blocs étaient très efficaces pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique normal de souris. L'objectif du travail présenté était d'évaluer le transfert du gène codant la mini-dystrophine murine dans le muscle pathologique de souris *mdx* à l'aide de ces vecteurs et l'impact de l'expression de la protéine synthétisée *de novo* dans les fibres musculaires sur l'expression et la localisation de certaines protéines du complexe glycoprotéique transmembranaire DGC.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Human Gene Therapy* :

**Amphiphilic block copolymers promote gene delivery *in vivo* to pathological skeletal muscles.**

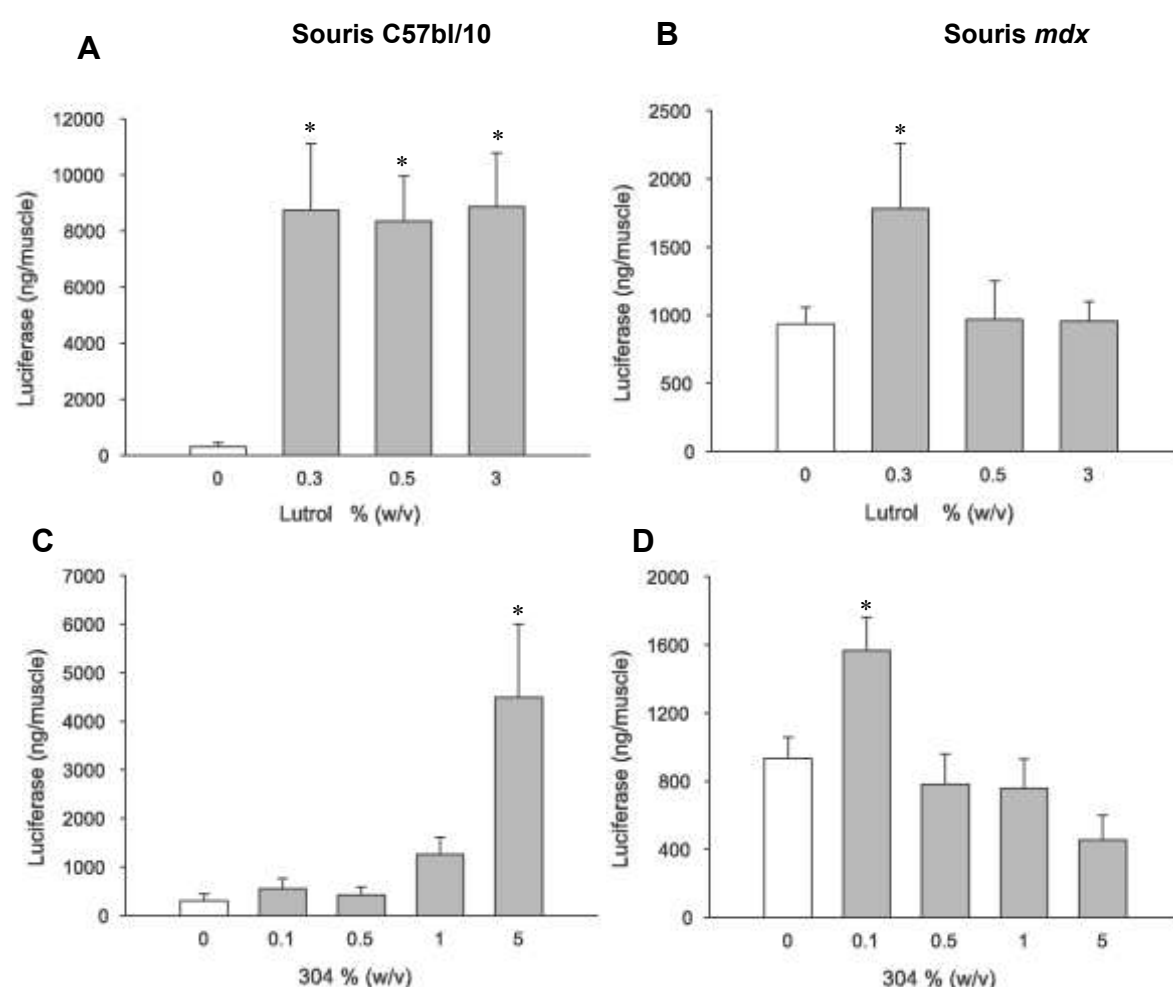
Richard P., Bossard F, Desigaux L, Lanctin C, Bello-Roufai M, Pitard B. *Hum Gene Ther.* 2005 Nov;16(11):1318-24.



### Evaluation de l'efficacité du transfert de gène dans le muscle dystrophique

Afin d'évaluer l'efficacité du transfert de gènes dans un muscle dystrophique comparativement à un muscle sain, nous avons utilisé les gènes rapporteurs codant la luciférase et la Green Fluorescent Protein (GFP). Les copolymères à blocs utilisés dans cette étude sont le Lutrol, le PE6400 et le 304.

Le plasmide codant la luciférase a été mélangé ou non avec le Lutrol ou le 304 à différentes concentrations (de 0,3% à 3% pour le Lutrol et de 0,1 à 5 % pour le 304). Ces formulations ont ensuite été injectées dans le tibial antérieur de souris saines C57bl/10 ou de souris myopathes *mdx*. L'activité luciférase a été mesurée 7 jours après l'injection et a été exprimée en ng de luciférase/muscle (Figure 23).



#### Figure 23-Transfert du gène codant la luciférase in vivo à l'aide de copolymères à blocs.

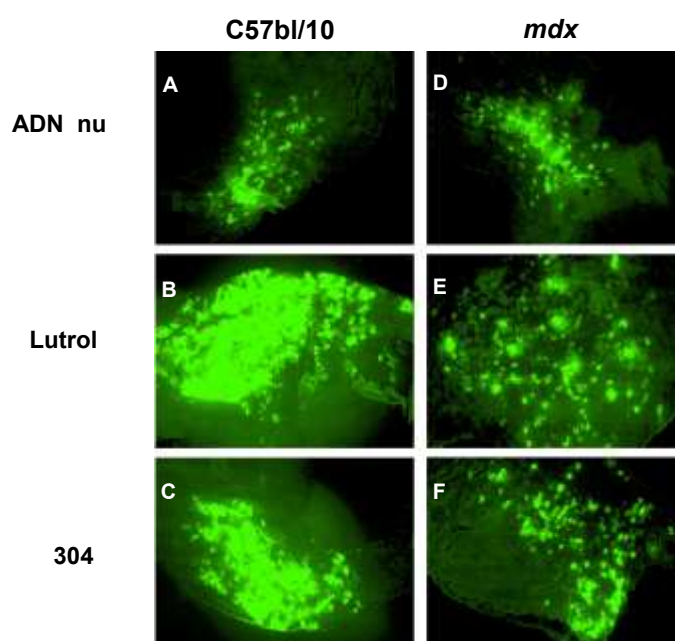
L'activité luciférase a été mesurée 7 jours après l'injection dans le tibial antérieur de souris C57bl/10 (A et C) et *mdx* (B et D) de 15  $\mu$ g d'ADN seul (barre vides) ou formulé avec différentes concentrations de Lutrol (A et B) ou de 304 (C et D) (barres pleines). Les histogrammes correspondent à la moyenne de six muscles. Les astérisques indiquent les différences significatives avec \*  $p < 0,01$  entre les muscles injectés avec l'ADN nu et avec l'ADN formulé avec les copolymères à blocs.

Chez la souris saine C57bl/10, les concentrations optimales sont respectivement pour le Lutrol et le 304 de 3% et 5% (Figures 23 A et C). A ces concentrations, les deux copolymères à blocs utilisés ont

permis d'augmenter d'un facteur 28 l'expression du gène de la luciférase par rapport à l'ADN nu. Ces résultats sont en accord avec des expériences préalablement réalisées au laboratoire sur d'autres souches de souris (*Pitard et al., 2004, Desigaux et al., 2005*).

Chez la souris *mdx*, les concentrations optimales sont respectivement de 0,3% et 0,1% pour le Lutrol et le 304. Elles ont permis d'obtenir une augmentation de l'expression du transgène que d'un facteur 2 par rapport à l'ADN nu (Figures 23 B et D). L'augmentation de la concentration des copolymères à blocs n'a pas permis l'augmentation de l'expression du transgène, bien au contraire, le transfert de gène avec des concentrations de copolymères habituellement utilisées chez les souris saines n'a induit aucun bénéfice par rapport à l'ADN nu. Des expériences similaires non présentées ont été réalisées avec le PE6400 et nous ont permis d'identifier les doses optimales de 0.05% pour la souris C57bl/10 et 0.005% pour la souris *mdx*. De façon intéressante, nous avons au contraire constaté que l'efficacité de transfection de l'ADN nu était légèrement supérieure dans le muscle pathologique de la souris *mdx* par rapport à la souris saine (Figures 23 A, B, C et D).

L'analyse de l'expression du gène codant la luciférase nous a apporté une information globale sur la quantité de protéine produite par le muscle mais ne nous a pas renseigné sur la bio-distribution de l'expression du transgène. Afin de connaître le nombre de cellules exprimant le gène injecté, nous avons utilisé un plasmide codant la GFP, une protéine fluorescente visible au microscope. Pour cela, nous avons injecté 50µg du plasmide codant la GFP seul ou formulé avec les concentrations optimisées de copolymères chez les souris C57bl/10 saines et *mdx*. Sept jours après le transfert de gène, nous avons visualisé l'expression de la GFP sur coupes histologiques (Figure 24).



**Figure 24-Coupes transversales de tibiaux antérieurs de souris C57bl/10 saines et *mdx*.**

L'expression de la GFP a été visualisée par microscopie 7 jours après l'injection de 50µg de plasmide pCMV-GFP en absence ou en présence de copolymères à blocs. Les sections **A, B, C** correspondent respectivement à l'injection chez la souris saine d'ADN : nu, formulé avec le Lutrol à 3%, ou avec le 304 à 5%. Les sections **D, E, F** correspondent respectivement à l'injection chez la souris *mdx* d'ADN : nu, formulé avec Lutrol à 0,3%, ou avec le 304 à 0,1%.

Cette expérience a montré et confirmé que l'efficacité de transfection de l'ADN nu dans le muscle squelettique était légèrement supérieure chez la souris *mdx* par rapport à la souris saine (Figures 24A et 24D). L'analyse histologique a également montré que le nombre de fibres musculaires *mdx* transfectées était augmenté lorsque le transfert de gène était réalisé en présence des copolymères à blocs par rapport à l'ADN nu (Figures 24 D, E et F). Cependant, chez la souris *mdx*, l'augmentation du nombre de fibres transfectées en présence de copolymères à blocs par rapport à l'ADN nu, est moins marquée que chez la souris saine (Figure 24 A comparée à B et C, figure 24D comparée à E et F). Ceci est en bon accord avec les résultats préalablement obtenus avec le gène codant la luciférase (Figure 23).

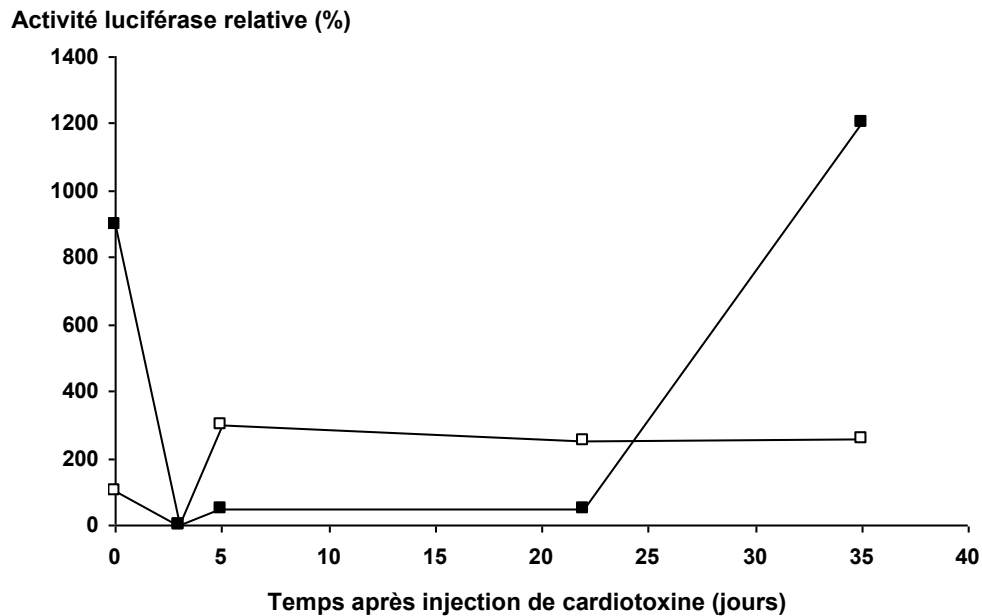
### ***Transfert de gène dans le muscle squelettique sain en régénérescence.***

Les muscles de souris *mdx* sont le siège de cycles de dégénérescence et de régénérescence pouvant influencer l'efficacité du transfert de gènes. Afin d'étudier l'influence de ces phénomènes sur l'efficacité du transfert de gènes, nous avons choisi de reproduire ces cycles de manière artificielle chez des souris saines. Pour cela, nous avons utilisé la cardiotoxine, il s'agit d'une toxine purifiée à partir du venin de serpent *Naja nigricollis*. Son injection dans le muscle induit une dégénérescence simultanée des cellules musculaires matures sans modifier leur vascularisation et leur innervation, et sans affecter les cellules satellites nécessaires à leur régénération (voir partie 2.2b de l'Introduction). Après une courte et intense période de nécrose (3 jours après l'administration de la cardiotoxine), les myotubes résultant de la fusion des cellules satellites se différencient pour progressivement former de nouvelles fibres musculaires. Le muscle endommagé retrouve une architecture normale un mois environ après l'induction de la nécrose (*Van Deutekom et al., 1998*).

Nous avons donc quantifié l'activité luciférase en fonction de l'état de maturation des fibres, après transfert de gènes en présence ou en absence de copolymère à blocs. Pour cela, les muscles tibiaux antérieur de souris saines ont été traités avec la cardiotoxine ou avec une solution contrôle de chlorure de sodium. Les souris ont été injectées, à différents temps (3 à 35 jours) après le début du traitement, avec 15 µg de plasmide codant la luciférase en absence ou en présence de copolymères. L'activité luciférase a été évaluée 7 jours après l'injection d'ADN nu ou formulé (Figure 25).

Lorsque l'injection d'ADN a lieu 3 jours après l'injection de la cardiotoxine, période de prolifération maximale des cellules satellites, on observe sur cette figure que l'activité luciférase relative est effondrée, que l'ADN injecté soit seul ou formulé. A partir du 5<sup>ème</sup> jour après l'injection de cardiotoxine, alors qu'a débuté la phase de croissance des myotubes, l'activité luciférase relative a évolué de manière différente selon que l'ADN injecté était seul ou formulé. L'injection d'ADN nu J5, J21 ou J35 après le traitement à la cardiotoxine a permis de doser une activité luciférase plus élevée que dans le muscle mature, c'est à dire avant l'administration de la cardiotoxine (J0). A l'opposé, lorsque l'ADN formulé avec le PE6400 à 0.05% a été injecté J5 à J21 après l'injection de cardiotoxine l'activité luciférase est restée effondrée durant toute cette période. La formulation copolymère à

blocs/ADN a donc été moins efficace que l'ADN nu pour le transfert de gène entre J5 et J21. Ce n'est effectivement qu'à partir du 35<sup>ème</sup> jour après l'administration de cardiotoxine, période à partir de laquelle la structure musculaire normale est restaurée, que la formulation a retrouvée son efficacité initiale.



**Figure 25-Activité luciférase relative dans le tibial antérieur de souris en régénérescence.**

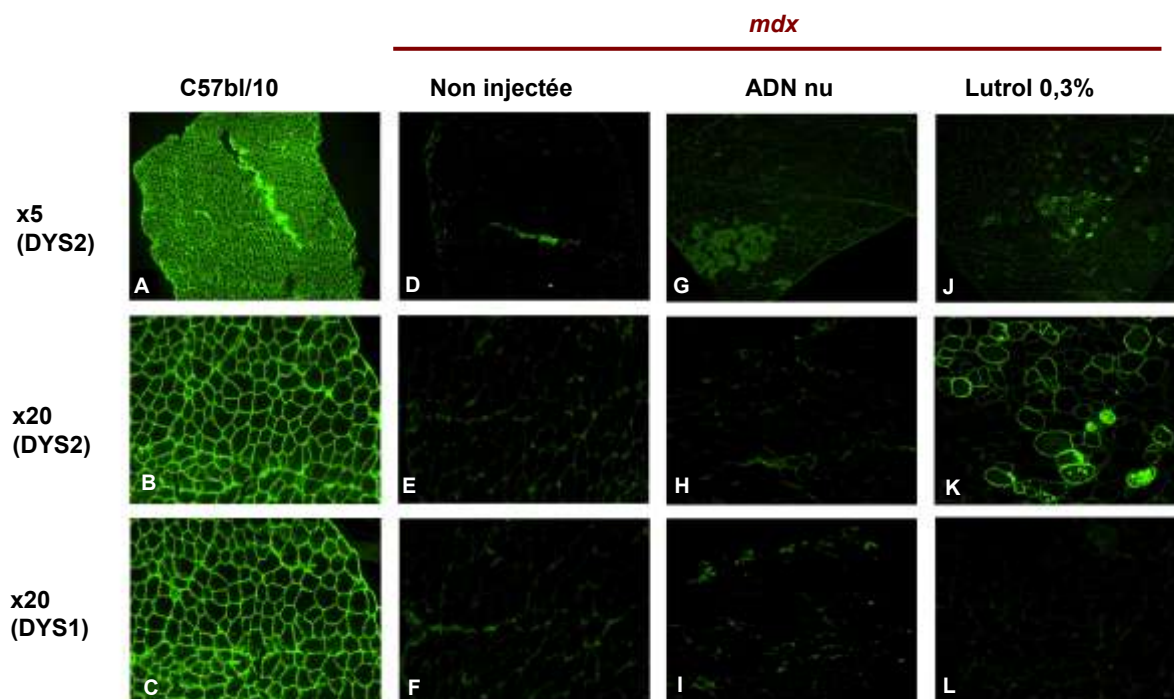
L'activité luciférase a été mesurée 7 jours après l'injection de 15 $\mu$ g de plasmide codant la luciférase en absence (carrés vides) ou en présence de PE6400 à 0.1% (carrés remplis). Les résultats représentent le ratio entre l'activité luciférase de l'ADN nu ou formulé avec le copolymère à blocs dans des muscles traités à la cardiotoxine (0.08 $\mu$ g/ $\mu$ l, soit 4  $\mu$ g/muscle) et l'activité luciférase de l'ADN nu ou formulé dans des muscles pré injectés avec le NaCl (150 mM).

Ces résultats suggèrent que l'inefficacité des copolymères à blocs, utilisés aux doses efficaces déterminées chez la souris saine adulte C57bl/10 (0.05% pour le PE6400, 3% pour le Lutrol et 5% pour le 304), à augmenter l'expression du transgène luciférase chez la souris *mdx* serait probablement due aux spécificités du muscle dystrophique subissant en permanence des cycles de dégénérescence/régénérescence. C'est sûrement pour cette raison que nous avons été contraint d'optimiser les doses de copolymères à blocs à injecter (0.005% pour le PE6400, 0,3% pour le Lutrol et 0.5% pour le 304) de façon à assurer un transfert efficace chez la souris *mdx* (Figure 23).

### **Transfert du gène codant la mini-dystrophine chez la souris *mdx*.**

L'objectif suivant de ce travail a été d'utiliser les copolymères à blocs aux doses optimisées chez la souris *mdx* pour délivrer le gène de la mini-dystrophine murine. Le plasmide utilisé code une protéine tronquée, délétée des séquences comprises entre les exons 13 et 49. Cette protéine dont la partie centrale ("rod domains") est très réduite conserve cependant les régions d'interaction avec les protéines du DGC.

Nous avons donc injecté 50 µg d'un plasmide codant la mini-dystrophine formulé avec les copolymères à blocs ou non dans le tibia antérieur de souris *mdx*. La dystrophine a été révélée par immunomarquage, 7 jours après l'injection, à l'aide de l'anticorps anti-dystrophine DYS2, spécifique de l'exon 79 et de l'anticorps DYS1, spécifique des exons 25 à 28 en tant que contrôle négatif (Figure 26).



**Figure 26-Immunomarquage de la dystrophine sur coupes transversales après transfert du gène non viral de la mini-dystrophine.**

La dystrophine a été détectée, 7 jours après l'injection, par immunofluorescence sur des sections en série à l'aide de l'anticorps DYS2 dirigé contre l'exon 79 de la dystrophine (deux premières lignes) et de l'anticorps DYS1 dirigé contre les exons 25 à 28 (dernière ligne). Les sections A-C représentent des muscles de souris saines C57bl/10. Les sections D-F représentent les muscles de souris *mdx* non injectées, les sections G-I, les muscles de souris *mdx* injectés avec 50 µg de plasmide codant la mini-dystrophine et les sections J-L, les muscles de souris *mdx* injectés avec 50 µg de plasmide codant la mini-dystrophine en présence de Lutrol à 0.3%. Les coupes ont été examinées aux objectifs 5 et 20 et au moins 4 muscles individuels ont été observés pour chaque groupe expérimental.

L'immunomarquage de la dystrophine, à l'aide des anticorps DYS1 et DYS2, sur biopsie de muscle sain a révélé la présence de la protéine au niveau du sarcolemme de toutes les fibres (Figures 26 A-C). Au contraire et logiquement aucun marquage de la dystrophine n'a pu être détecté chez la souris *mdx* non injectée (Figures 26 D-F). Chez ces souris seules quelques fibres révertantes peuvent être révélées (environ 1%).

Sur cette figure nous observons qu'une semaine après l'injection intramusculaire des formulations, contenant 50 µg du plasmide codant la mini-dystrophine et le Lutrol à 0.3% chez les souris *mdx* (Figures 26 J-L), de nombreuses fibres expriment spécifiquement la dystrophine comparativement aux souris *mdx* injectées avec l'ADN nu (Figures 26 G-I). L'expression de la dystrophine est plus intense autour de la zone d'injection (Figure 26J). Notons que le niveau d'expression de la dystrophine est

corrélé avec l'intensité de fluorescence. La figure 26K montre que la dystrophine est détectée dans certaines fibres musculaires *mdx* à différentes étapes de sa synthèse, en effet on observe un marquage positif de la dystrophine aussi bien dans les différents compartiments du cytoplasme qu'à la membrane des fibres musculaires transfectées. L'immunomarquage de la dystrophine a été détecté chez la souris *mdx* pendant au moins 4 semaines après l'injection intramusculaire de la formulation copolymère à blocs/ADN (données non présentées). Ces résultats suggèrent l'absence de réponse immunitaire dirigée contre la dystrophine murine après transfert du gène codant la mini-dystrophine formulé chez la souris *mdx*.

Le nombre de fibres exprimant la dystrophine (en soustrayant les fibres révertantes) a été quantifié sur des sections issues de quatre muscles *mdx* différents injectés avec l'ADN seul ou formulé avec le Lutrol à 0.3%. Au bout de 7 jours, le nombre de fibres immuno-positives était de 78 +/- 50 chez les souris *mdx* injectées avec la formulation Lutrol/ADN contre 2.6 +/- 1.8 chez les souris *mdx* injectées avec l'ADN nu. Ceci traduit donc une augmentation de l'expression du gène codant la dystrophine de 30 fois en présence de Lutrol 0.3% comparé à l'ADN nu. En estimant que le tibia antérieur de souris est composé d'environ 1000 fibres, nous estimons donc que la transfection a permis l'expression de la dystrophine dans environ 10 % des fibres du muscle squelettique de souris *mdx*.

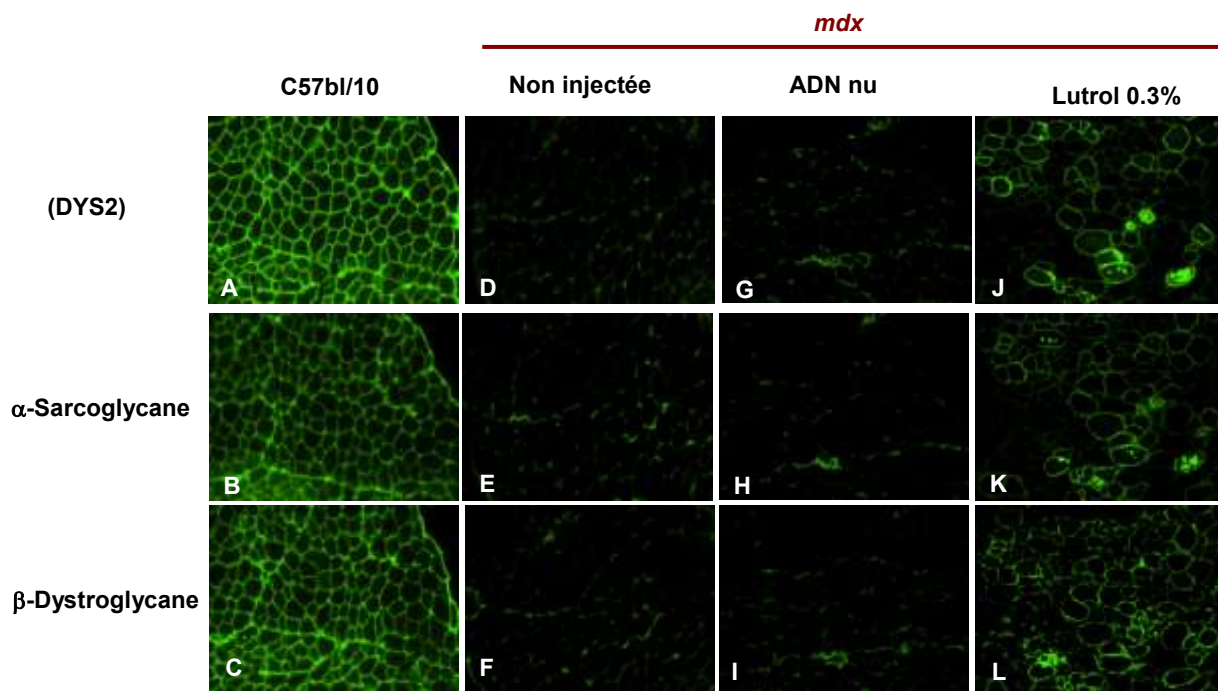
### ***Restauration des protéines du complexe DGC à la membrane des fibres après transfert du gène codant la mini-dystrophine.***

Il a été démontré que la dystrophine tronquée doit contenir au moins 4 domaines rod centraux et 3 régions charnières, en plus des régions indispensables d'interaction protéiques, pour restaurer le complexe DGC à la membrane des fibres et pour permettre la transition d'un phénotype « dystrophie de Duchenne » à un phénotype atténué « dystrophie de Becker » (Sakamoto *et al.*, 2002).

Nous avons donc voulu vérifier que l'expression de la mini-dystrophine au sein des fibres musculaires de souris *mdx* après transfert de gène permettait la restauration des protéines du complexe DGC à la membrane des cellules en réalisant un immunomarquage de l' $\alpha$ -sarcoglycane et de la  $\beta$ -dystroglycane à l'aide d'anticorps spécifiques (Figure 27).

L'absence de dystrophine dans les fibres musculaires de souris *mdx* (Figure 27 D) résulte en une réduction dramatique des protéines du complexe DGC à la surface des cellules (Figures 27 E et F) comparativement aux fibres musculaires de souris saines (Figures 27 A à C).

Après une seule injection de la formulation contenant 50  $\mu$ g d'ADN et le Lutrol à 0.3% dans le tibia antérieur de souris *mdx*, nous avons pu observer sur les coupes sériées que la détection de la dystrophine était associée à celle des protéines du complexe DGC à la surface des fibres dystrophiques (Figures 27 J-L). En revanche, l'injection de l'ADN nu dans le muscle de souris *mdx* n'a permis de mettre en évidence ni la dystrophine (Figure 27 G) ni l' $\alpha$ -sarcoglycane et la  $\beta$ -dystroglycane à la membrane des fibres musculaires (Figures 27 H et I).



**Figure 27-Détection des fibres exprimant la dystrophine et ses protéines associées du complexe DGC.**

La dystrophine, l' $\alpha$ -sarcoglycane et la  $\beta$ -dystroglycane ont été détectées, 7 jours après l'injection, par immunofluorescence sur des sections en série à l'aide d'anticorps spécifiques. Les sections A-C représentent des muscles de souris saines C57bl/10. Les sections D-F représentent les muscles de souris mdx non injectées, les sections G-I, les muscles de souris mdx injectés avec 50  $\mu$ g de plasmide codant la mini-dystrophine et les sections J-L, les muscles de souris mdx injectés avec 50  $\mu$ g de plasmide codant la mini-dystrophine en présence de Lutrol à 0.3%. Les coupes ont été examinées à objectif 20 et au moins 4 muscles individuels ont été observés pour chaque groupe expérimental.

Dans l'étude présentée, nous avons donc montré l'intérêt d'utiliser les copolymères à blocs pour délivrer un plasmide de grande taille (16.1 kb) codant la mini-dystrophine murine dans le muscle de souris mdx, modèle murin de la DMD. Le transfert de gène à l'aide des copolymères à blocs représente donc une preuve de concept aboutissant à la restauration de l'expression non seulement de la dystrophine mais aussi des protéines du complexe DGC à la membrane des fibres musculaires de souris mdx.

## Chapitre 2.

# Sécrétion ectopique de protéines à partir du muscle squelettique après transfert de gène.

*"Avec la thérapie génique, le gène devient un possible médicament. La thérapie génique pourra s'appliquer, évidemment, à des maladies génétiques, et, plus généralement, à toutes les affections, héréditaires ou acquises, qui peuvent bénéficier du traitement par une protéine thérapeutique. En effet, il est, en principe, toujours possible de remplacer un médicament protéique par le gène qui va en commander la synthèse dans les propres cellules du malade qu'il faut soigner. En ce sens, la thérapie génique constitue la troisième étape de l'utilisation des protéines médicamenteuses. La première est celle de la purification à partir de tissus ou de fluides animaux ou humains ; la seconde est le génie génétique, où l'on asservit des micro-organismes à produire le médicament protéique en leur transférant le gène correspondant ; la thérapie génique, enfin, transfère directement l'ADN dans l'organisme qu'il faut soigner, des cellules de celui-ci devenant des microfabriques du médicament et des microsystèmes de sa délivrance au malade."*

**Axel Kahn**, *"Thérapie génique: thérapie du gène et gène médicament"*

Le **muscle squelettique** de part sa composition et ses caractéristiques est un organe de choix pour le transfert de gènes codant des protéines sécrétées dans la circulation générale (voir partie 4.2 de l'Introduction). Parmi toutes les pathologies ciblées, ma thèse se focalise sur le traitement de **l'anémie au cours de l'insuffisance rénale chronique** (IRC). Le transfert de gène de l'EPO à l'aide de techniques de transfert de gène virales ou non virales a été décrit récemment comme une technique envisageable pour le traitement de l'anémie chez des rats et des patients insuffisants rénaux (*Rizzuto et al., 2000, Maruyama et al., 2001, Ataka et al., 2003, Lippin et al., 2005*). Les objectifs du travail présenté étaient d'une part d'évaluer l'efficacité de transfection du gène codant l'EPO murine (EPOm) dans le muscle squelettique de souris saine à l'aide des copolymères à blocs et d'autre part d'évaluer l'effet thérapeutique du transfert du gène codant l'EPOm à l'aide des copolymères à blocs dans le muscle squelettique d'un modèle de souris anémiques en insuffisance rénale chronique.

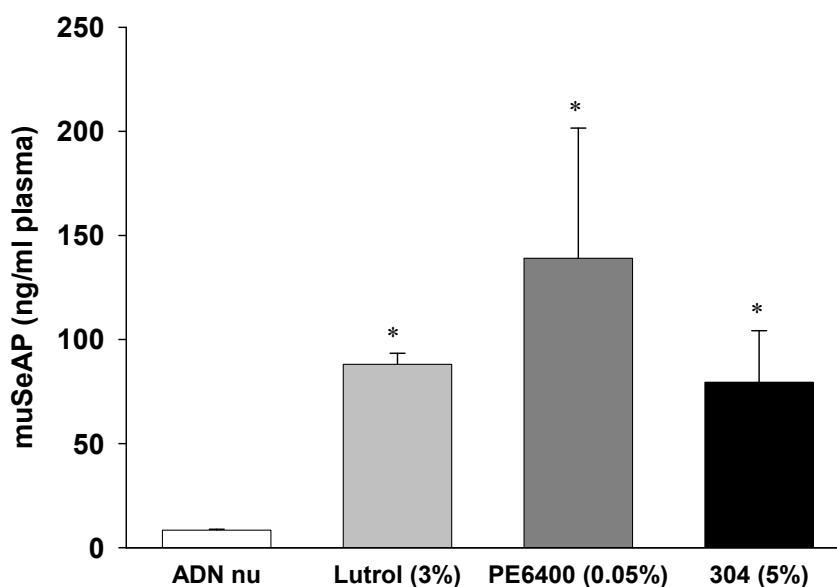
Ces travaux font l'objet d'une publication en cours de révision dans le journal *Human Gene Therapy* : **Therapy of anemia by plasmid EPO cDNA in kidney failure.**

Peggy Richard-Fiardo, Emmanuel Payen, Léa Desigaux, Julien Zuber, Raphaël Chèvre, Yves Beuzard and Bruno Pitard.



### ***Transfert de gènes codant des protéines sécrétées à l'aide de copolymères à blocs dans le muscle squelettique.***

L'injection dans le tibial antérieur de souris Swiss d'un plasmide codant une forme sécrétée de la phosphatase alcaline, nous a permis de vérifier que le muscle squelettique est effectivement un organe d'intérêt pour la sécrétion de protéines systémiques après transfert de gène à l'aide de copolymères à blocs (Figure 28). Les concentrations des copolymères à blocs utilisés pour cette étude (le Lutrol, le PE6400 et le 304) ont été établies d'après des résultats préalablement obtenus au laboratoire (Pitard *et al.*, 2002, Pitard *et al.*, 2004).

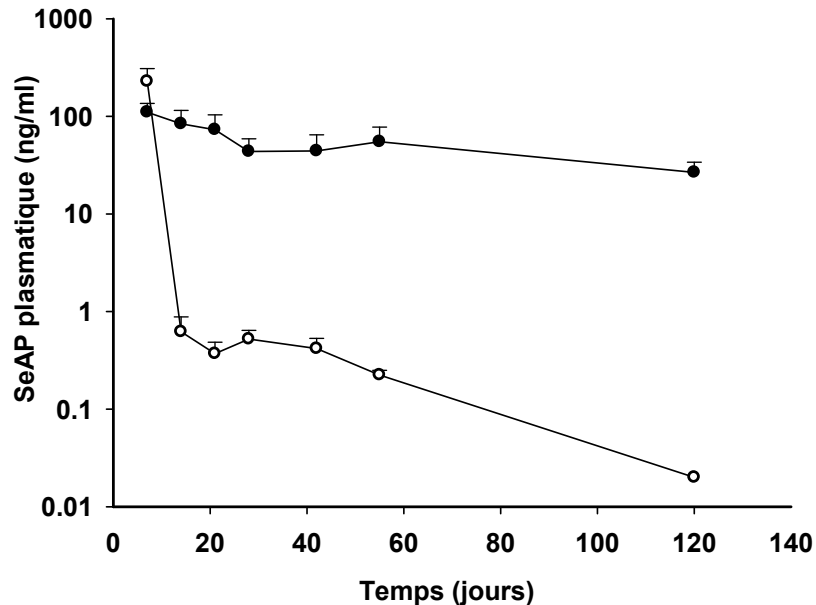


***Figure 28-Dosage de l'activité phosphatase alcaline murine dans le plasma des souris injectées avec différents copolymères à blocs.***

L'activité de la phosphatase alcaline murine (muSeAP) a été déterminée dans le plasma des souris 7 jours après l'injection intramusculaire de 30 µg du plasmide pvt-20 seul (histogramme blanc) ou en présence de différents copolymères à blocs : le Lutrol à 3% (histogramme gris clair), le PE6400 0.05% (histogramme gris foncé) le 304 à 5% (histogramme noir). Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental. Les astérisques indiquent les différences significatives avec  $*p < 0,05$  entre les muscles injectés avec l'ADN nu et avec l'ADN formulé avec les copolymères à blocs

Sept jours après l'injection intramusculaire du plasmide codant la phosphatase alcaline murine (muSeAP) formulé ou non avec des copolymères à blocs, nous avons dosé l'activité plasmatique de la protéine. Les résultats indiquent que l'utilisation de copolymères (Lutrol, PE6400 et 304) a permis d'augmenter significativement l'efficacité de transfection dans le tibial antérieur de souris par rapport à l'ADN nu d'un facteur 8 en moyenne.

Nous avons ensuite dosé l'activité SeAP à différents temps après l'injection de formulations contenant le plasmide codant la SeAP humaine (hSeAP) ou la murine (muSeAP) et le Lutrol 3% dans le tibia antérieur de souris Swiss immunocompétentes (Figure 29).



**Figure 29-Dosage de l'activité phosphatase alcaline dans le plasma des souris à différents temps après le transfert de gènes.**

L'activité de la phosphatase alcaline murine (muSeAP) ou humaine (hSeAP) a été déterminée dans le plasma des souris différents temps après l'injection intramusculaire des formulations contenant 30 µg du plasmide codant la muSeAP (cercles noir) ou 30 µg du plasmide codant la hSeAP (cercles blanc) et le Lutrol à 3%. Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental.

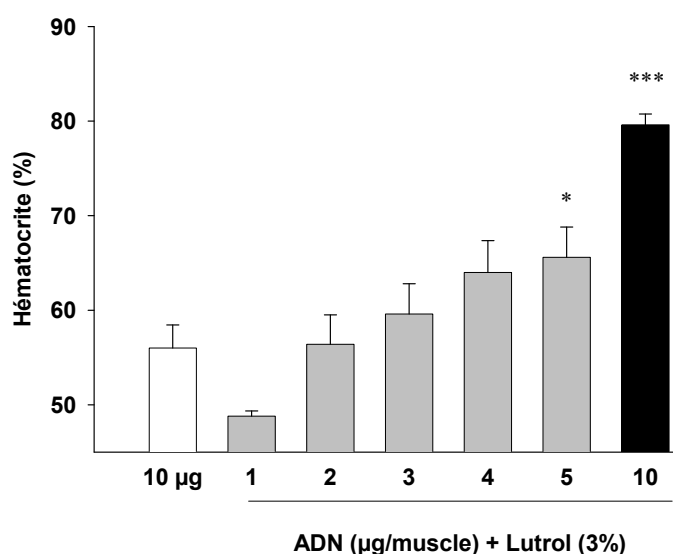
Sur cette figure, on observe que le maximum d'activité phosphatase alcaline plasmatique est obtenue 7 jours après le transfert de gène, mais contrairement à l'activité phosphatase alcaline murine, l'activité phosphatase alcaline humaine chute rapidement dès 14 jours après l'injection avant d'atteindre un niveau très faible au bout de 120 jours. La perte d'activité hSeAP plasmatique au cours du temps après injection intramusculaire pourrait s'expliquer par la mise en place d'une réaction immunitaire dirigée contre la protéine d'origine humaine (Wang et al., 2001). En effet, nous avons montré que le muscle était capable de sécréter la muSeAP d'origine murine pendant au moins 120 jours après injection intramusculaire du plasmide pvt-20 en présence de Lutrol à 3%. Le transfert de gènes à l'aide de copolymères à blocs permet donc la sécrétion d'une protéine murine sur le long terme après injection intramusculaire chez la souris Swiss immunocompétente.

### **Traitement de l'anémie acquise au cours de l'insuffisance rénale chronique chez la souris.**

Ayant pour objectif de développer un protocole simple et sûr de transfert du gène codant l'érythropoïétine (EPO) pour le traitement de l'anémie associée à l'insuffisance rénale chronique (IRC), nous avons dans un premier temps étudié le transfert de gène de l'EPO murine (EPOm) à l'aide de copolymères à blocs dans le muscle squelettique de souris saines. Ensuite, nous avons validé notre système de transfection dans un modèle de souris anémiques en IRC en collaboration avec l'équipe du Pr. BEUZARD (Laboratoire de Thérapie Génique Hématopoïétique, hôpital Saint Louis, INSERM U733, Paris).

### **Sécrétion d'érythropoïétine après transfert de gène dans le muscle squelettique**

Tout d'abord nous avons évalué le potentiel des copolymères à blocs pour la transfection du gène codant l'EPO murine (mEPO) dans le muscle squelettique afin de permettre la sécrétion efficace de la protéine dans la circulation. Des quantités croissantes du plasmide pCMV-mEPO ont été injectées, en absence ou en présence de Lutrol à 3%, dans le tibia antérieur de souris Swiss immunocompétentes. L'efficacité du transfert de gène a été évaluée en mesurant le taux d'hématocrite (nombre de globules rouges/volume de sang total) 14 jours après l'injection intramusculaire (Figure 30).



### **Figure 30-Mesure de l'hématocrite des souris après transfert de gène dans le muscle squelettique.**

L'hématocrite des souris injectées avec 10 µg d'ADN nu (barre vide) ou avec des quantités croissantes d'ADN (de 1 à 10 µg/muscle) formulé avec le Lutrol à 3% a été évalué 14 jours après l'injection intramusculaire. Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental. Les astérisques indiquent les différences significatives avec \*  $p < 0,05$  et \*\*\*  $p < 0,001$  entre les souris injectées avec le Lutrol 3% par rapport aux souris injectées avec l'ADN nu.

La valeur moyenne de l'hématocrite d'une souris naïve ou avant injection est comprise entre 48 et 50%. Des injections de quantités croissantes du plasmide pCMV-mEPO nu nous ont permis de

déterminer que la dose minimale de plasmide à injecter pour observer un effet significatif sur le taux d'hématocrite au bout de 14 jours est de 10 µg/muscle.

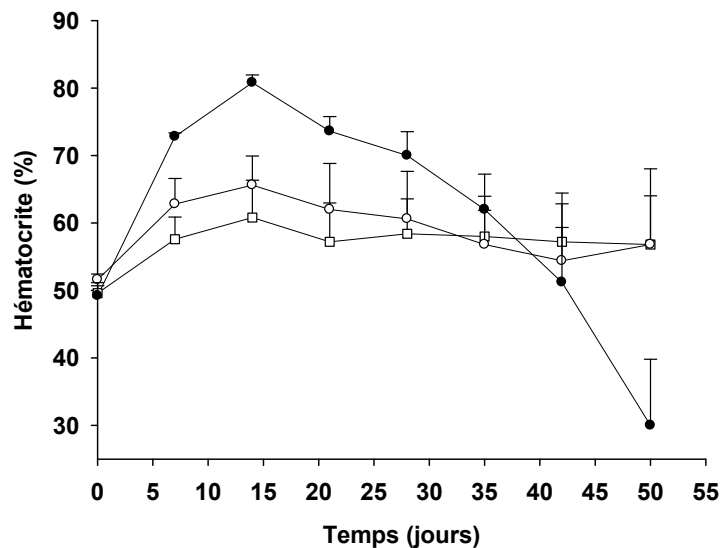
Sur la figure 33, nous observons que le taux d'hématocrite moyen des souris est augmenté de façon dose dépendante avec la quantité d'ADN injecté et formulé avec le Lutrol 3%. L'injection de 10 µg d'ADN formulé a permis d'obtenir un taux moyen d'hématocrite d'une valeur maximale de 80% environ. Ce taux moyen d'hématocrite devient significativement différent à partir d'une injection de 5 µg d'ADN formulé par rapport à l'injection de 10µg d'ADN nu. Au bout de 14 jours, l'injection de 2 µg d'ADN formulé avec le Lutrol 3% a permis d'obtenir un taux d'hématocrite similaire à celui obtenu après l'injection de 10 µg d'ADN seul. L'utilisation du Lutrol à 3% a donc permis de réduire de 5 fois la quantité d'ADN à administrer pour observer un effet significatif sur le taux d'hématocrite des souris par rapport à l'ADN nu. Chez ces mêmes souris, la quantité d'EPO sécrétée dans la circulation générale a été déterminée 14 jours après l'injection intramusculaire grâce à un test ELISA (Tableau 4).

pCMV-mEPO (µg/muscle)	EPO sérique (mU/ml)
10 µg	7.7 +/-2.4
1 µg + Lutrol 3%	7.0 +/-0.9
2 µg + Lutrol 3%	7.4 +/-0.5
3 µg + Lutrol 3%	12.6 +/-4.0
4 µg + Lutrol 3%	21.3 +/-3.7
5 µg + Lutrol 3%	22.6 +/-3.7
10 µg + Lutrol 3%	116.8 +/-44.3

**Tableau 4-Dosage de l'EPO sérique des souris après transfert de gène dans le muscle squelettique.** La concentration d'EPO sérique des souris injectées avec 10 µg du plasmide pCMV-mEPO seul ou injectées avec des quantités croissantes de plasmide (de 1 à 10 µg/muscle) formulé avec le Lutrol à 3% a été déterminée 14 jours après l'injection intramusculaire. Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental. Les valeurs moyennes d'EPO sérique de souris naïves (non injectées) sont en dessous du seuil de détection du kit de dosage.

Nous observons que l'injection intramusculaire de 10 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3% permet d'obtenir une concentration sérique d'EPO de 116.8 +/- 44.3 mU/ml contre 7.7 +/- 2.4 mU/ml pour l'ADN nu soit une augmentation d'un facteur 15.

Nous avons ensuite suivi le taux d'hématocrite des souris Swiss injectées avec des quantités croissantes d'ADN formulé en fonction du temps (Figure 31). La quantité minimale d'ADN formulé à injecter pour obtenir un effet significatif sur le taux d'hématocrite par rapport à des souris non injectées a été déterminée. La dose retenue est celle de 2.5µg de plasmide pCMV-mEPO par muscle.

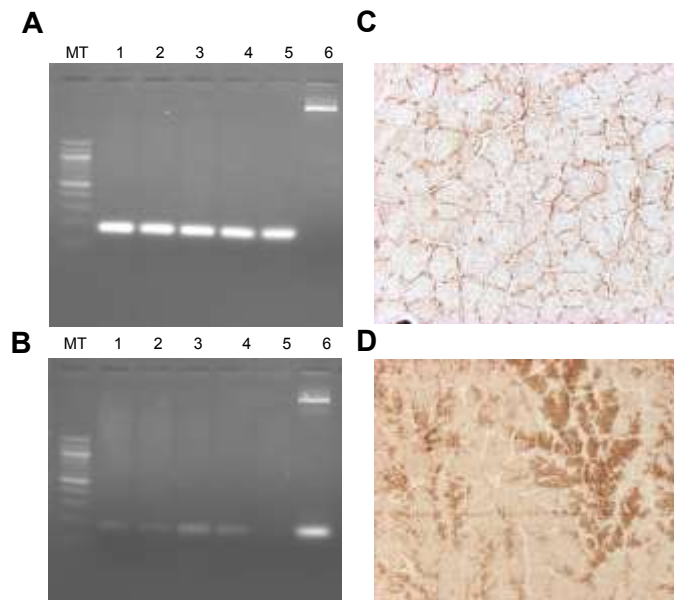


**Figure 31-Suivi du taux d'hématocrite des souris après transfert de gène dans le muscle squelettique.**

L'hématocrite des souris injectées avec 2.5 µg (□), 5 µg (○) ou 10 µg (■) du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol à 3% a été évalué à différents temps après l'injection intramusculaire. Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental.

L'injection intramusculaire de 10 µg de plasmide formulé a permis d'obtenir une valeur moyenne du taux d'hématocrite maximale d'environ 80% 14 jours post-injection avant de chuter brutalement et d'atteindre une valeur inférieure à la valeur basale (30.0 +/- 9.8%) au bout de 50 jours. Dans ce groupe, 4 souris sur 6 présentent une anémie sévère 50 jours après l'injection. Chez ces souris anémiques, les valeurs d'EPO sérique déterminées 14 jours et 50 jours après l'injection étaient respectivement de 98.3 +/- 26.7 mU/ml et 85.5 +/- 25.7 mU/ml. A la lumière de ce dosage d'EPO sérique, le muscle des souris anémiques injectées avec 10 µg de plasmide formulé semble encore être en mesure de sécréter l'EPO dans la circulation après 50 jours. Les injections de doses plus faibles d'ADN, 2.5 et 5 µg de plasmide formulé avec le Lutrol 3% ont permis d'observer des taux d'hématocrite stables au moins pendant 50 jours. Des résultats similaires ont été obtenus avec les copolymères à blocs PE6400 et 304. Une expérience non présentée sur cette figure a montré que l'injection de 10 µg d'ADN ne permettait une élévation du taux d'hématocrite (atteignant 56% environ) stable dans le temps, aucune anémie n'a été mise en évidence chez ces souris au bout de 50 jours.

L'injection du plasmide pvt-20 codant la phosphatase alcaline murine formulé avec le Lutrol à 3%, nous a permis de démontrer que le muscle squelettique était capable de sécréter de façon stable une protéine murine pendant au moins 120 jours (Figure 29). Nous avons donc réalisé une expérience visant à évaluer la présence du transcrite et de la protéine EPO dans les tibiaux antérieurs de souris 50 jours après l'injection de 10 µg d'ADN formulé avec le Lutrol 3% (Figure 32).



**Figure 32-Détection du transcrite et de la protéine EPO 50 jours après transfert de gène dans le muscle squelettique de souris.**

Le transcrite correspondant au plasmide pCMV-mEPO a été détecté dans les tibiaux de souris injectées avec 10 µg d'ADN formulé avec le Lutrol à 3% par RT-PCR (B). Pour contrôle, nous avons aussi détecté l'ARN messager correspondant à la G3PDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase murine (A). La ligne MT correspond au marqueur de taille, les lignes 1 à 4 correspondent à des souris injectées avec 10 µg de plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol à 3% et ayant des taux d'hématocrite inférieurs à la valeur basale, la ligne 5 correspond à une souris non injectée et enfin la ligne 6 correspond au plasmide pCMV-mEPO purifié. La présence de la protéine EPO a été détectée par immunomarquage dans les muscles de souris injectées avec le Lutrol à 3 % seul (C) ou avec 10 µg du plasmide pCMV-mEPO (D).

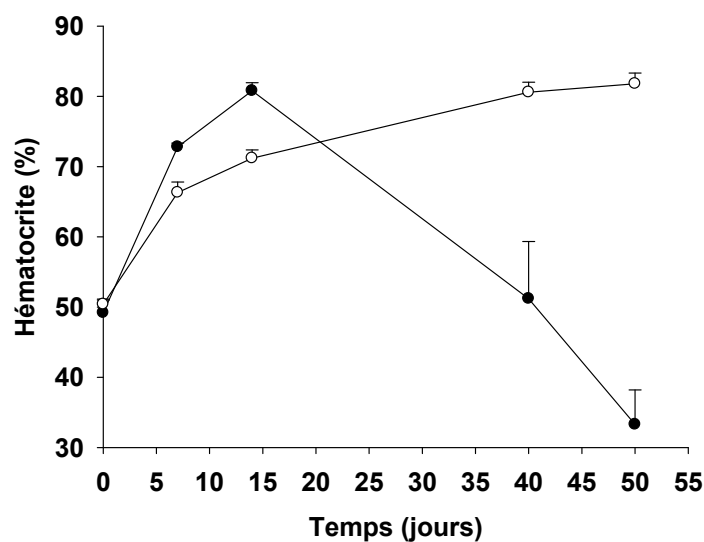
Les résultats de RT-PCR montrent que le transcrite issu du plasmide pCMV-mEPO est encore détectable dans le broyat musculaire de souris anémiques 50 jours après l'injection (Figure 32 B). De même, l'immunomarquage de la protéine EPO 50 jours après l'injection intramusculaire, montre que la protéine est encore sécrétée par les fibres musculaires sans pour autant avoir d'impact sur la valeur de l'hématocrite (Figure 32 D).

### ***Anémie autoimmune après transfert du gène codant l'EPOm chez la souris Swiss immunocompétente.***

Afin d'expliquer cette chute brutale du taux d'hématocrite observée chez les souris injectées avec 10 µg de pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3%, plusieurs expériences ont été réalisées.

#### **• Importance de la souche de souris.**

Nous avons réalisé des injections intramusculaires de 10 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3% chez une autre souche de souris utilisée couramment dans la littérature pour le transfert du gène codant l'EPOm, il s'agit de la souris de souche C57bl/6 (Figure 33).



***Figure 33-Suivi du taux d'hématocrite après transfert de gène dans le muscle squelettique de souris Swiss et C57bl/6.***

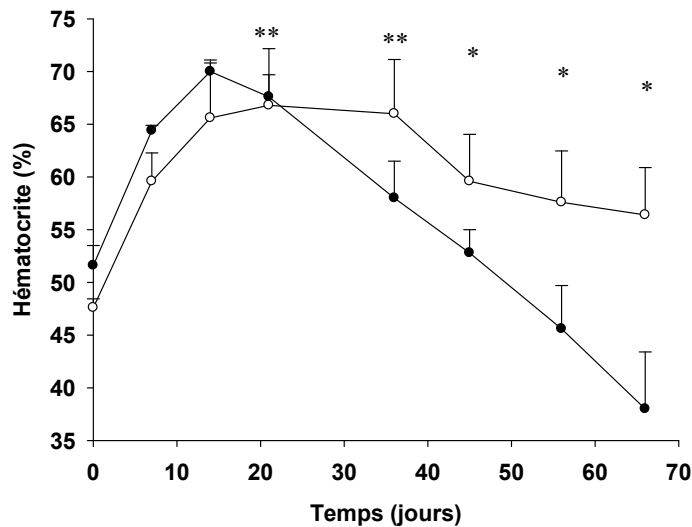
*L'hématocrite des souris Swiss (●) ou C57bl/6 (○) injectées avec 10 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol à 3% a été évalué à différents temps après l'injection intramusculaire. Au moins 10 animaux ont été inclus par groupe expérimental.*

Contrairement à ce qui a été observé chez les souris Swiss, l'injection de 10 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol à 3% chez la souris C57bl/6 a induit une augmentation progressive et stable du taux d'hématocrite pendant 50 jours au moins. Ces résultats confirment ce qui a été publié dans la littérature pour le transfert du gène codant l'EPOm à l'aide d'une autre technique de transfert de gènes non virale, l'électrotransfert (*Kreiss et al., 1999, Payen et al., 2001a*). Notons, que le taux maximal d'hématocrite atteint à J14 chez les souris Swiss (80% environ) est atteint beaucoup plus tard (J50 environ) chez les souris C57bl/6, une sécrétion moins rapide d'EPOm semble donc avoir lieu chez les souris C57bl/6 après transfert de gène dans le muscle squelettique.





consécutif à l'injection de 10 µg du plasmide formulé (flèches noires). Les cellules infiltrant le muscle n'ont pas été caractérisées, il pourrait s'agir de macrophages, de cellules dendritiques ou encore de lymphocytes. Chez les souris Swiss injectées avec 10 µg de plasmide formulé nous suspectons la mise en place d'une réponse immune spécifique dirigée non seulement contre le produit du transgène, l'EPO murine recombinante, mais aussi contre l'EPO endogène conduisant à une anémie auto-immune. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons suivi l'hématocrite de souris Swiss injectées avec 10 µg de pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3% et traitées ou non avec un immunosuppresseur, la cyclosporine (Figure 35).



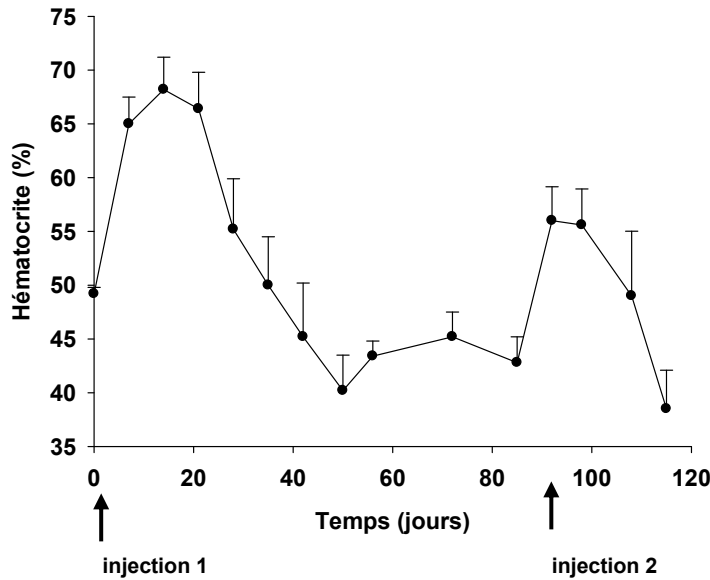
**Figure 35-Suivi du taux d'hématocrite après transfert de gène dans le muscle squelettique de souris immunosupprimées.**

L'hématocrite des souris traitées (○) ou non (●) avec la cyclosporine (10 mg/kg/jour pendant 66 jours) et injectées avec 10 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol à 3% a été évalué à différents temps après l'injection intramusculaire. Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental. Les astérisques indiquent les différences significatives avec \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$  entre les souris injectées et traitées à différents temps par rapport aux mêmes souris avant injection.

Contrairement à ce que nous avons observé chez les souris immunocompétentes, le taux moyen d'hématocrite des souris immunosupprimées et injectées avec 10 µg de plasmide formulé avec le Lutrol 3% atteint une valeur maximale de 65% environ aux alentours du 20<sup>ème</sup> jour post-injection et évolue entre 65 et 57% environ au moins pendant 66 jours.

Ces résultats confirment bien le fait qu'une réponse immunitaire serait impliquée dans la chute du taux d'hématocrite.

La présence d'anticorps ou de lymphocytes cytotoxiques (CTL) devrait freiner l'augmentation du taux d'hématocrite lors de ré-injections intramusculaires d'ADN formulé. Une autre façon de mettre en évidence la mise en place d'une réponse immunitaire a consisté en la réalisation de 2 injections successives de 10 $\mu$ g d'ADN formulé chez des souris Swiss immunocompétentes (Figure 36).



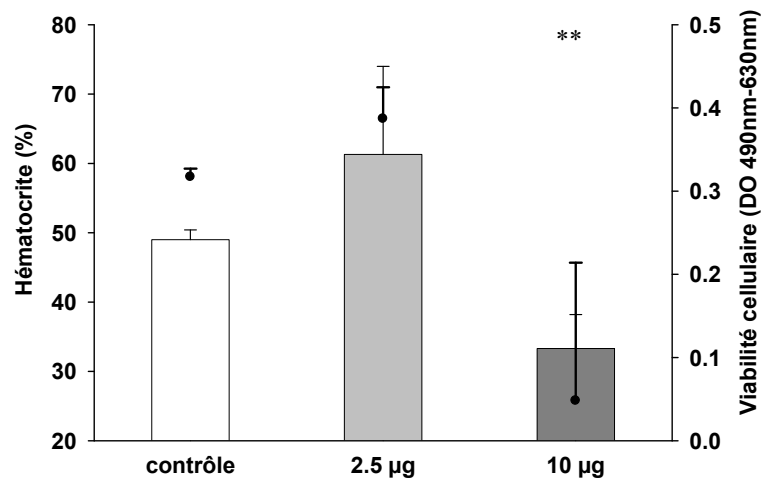
**Figure 36**—Suivi du taux d'hématocrite après transfert de gène dans le muscle squelettique de souris Swiss.

L'hématocrite de souris Swiss injectées avec 10  $\mu$ g du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol à 3% a été évalué à différents temps après l'injection intramusculaire. Deux injections ont été réalisées, la première a eu lieu au temps 0 et la deuxième a été effectuée 85 jours après (flèches noires). Au moins 10 animaux ont été inclus.

La première injection (à t=0) de 10  $\mu$ g de plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3% a permis une augmentation du taux d'hématocrite de 20 % en moyenne (de 48% à 68% environ). Ensuite, le taux d'hématocrite a diminué brutalement pour atteindre un niveau minimal 50 jours après l'injection. Pendant les 35 jours suivants, la valeur moyenne du taux d'hématocrite a légèrement remonté pour se stabiliser en dessous de la valeur basale (aux alentours de 42 %). Une deuxième injection de 10  $\mu$ g de plasmide formulé a été réalisée chez ces souris au jour 85. Cette 2<sup>ème</sup> injection a induit une élévation du taux d'hématocrite de seulement 10 % en moyenne (de 45% à 55% environ). Cette deuxième injection a donc été 2 fois moins efficace que la première.

Cette cinétique pourrait s'expliquer par la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique dirigée contre l'EPO limitant ainsi l'effet d'injections répétées par la présence d'anticorps. Cette réponse immune serait sans doute de type humorale car nous avons montré que les fibres transfectées continuent à produire et à sécréter l'EPO (Figure 32). Les anticorps auto-immuns ainsi développés seraient dirigés contre des épitopes conformationnels de l'EPO car le séquençage du gène endogène codant l'EPO sérique chez les souris anémiques injectés avec 10  $\mu$ g de plasmide formulé a permis de

conclure que la séquence du gène endogène était identique à la séquence codante contenue dans le plasmide. Ces anticorps neutralisants empêcheraient ainsi la fixation de l'EPO sur ses récepteurs présents à la surface des cellules progénitrices de la moelle osseuse pour stimuler leur multiplication et leur maturation en érythrocytes. La neutralisation de l'EPO sécrétée par le muscle et de l'EPO endogène aboutirait ainsi à l'apparition d'une anémie autoimmune chez les souris Swiss. Nous avons recherché la présence d'anticorps neutralisants dirigés contre l'EPO dans le sérum des souris anémiques injectées avec 10 µg de plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3% (Figure 37).



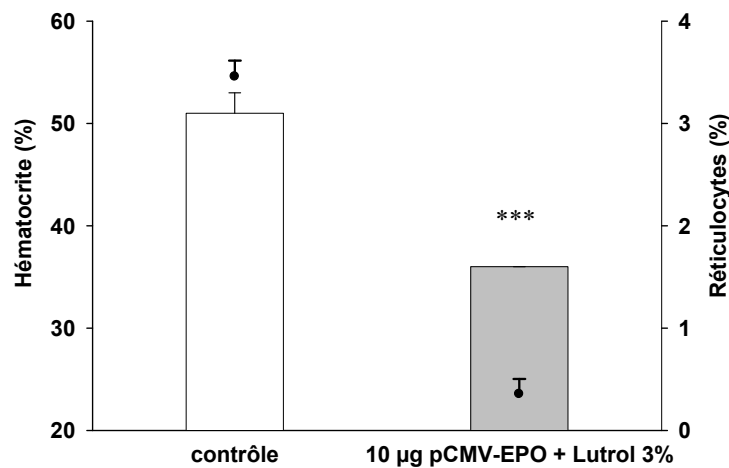
**Figure 37-Inhibition de la fonctionnalité de l'EPO recombinante par le sérum de souris anémiques après transfert de gènes.**

L'hématocrite de souris Swiss injectées (barres pleines) ou non (barre vide) avec 2.5 ou 10 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol à 3% a été évalué 50 jours après l'injection intramusculaire. Chez ces mêmes souris, un test de fonctionnalité de l'EPO recombinante a été réalisé grâce à une méthode indirecte basée sur la mesure de la pousse de cellules DaE-7 en culture. La viabilité cellulaire est représentée par la mesure de la densité optique moyenne des cellules DaE-7 (DO490 nm-630 nm) (cercles). Au moins 4 animaux ont été inclus par groupe expérimental. L'astérisque indique une différence significative avec \*\*  $p < 0,005$  entre l'hématocrite et la densité optique des souris injectées avec 10 µg de pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3% par rapport aux souris non injectées.

L'habilité des sérums de souris, obtenus 50 jours après l'injection de 2.5 ou 10 µg de plasmide pCMV-mEPO formulé, à neutraliser et abolir la croissance de cellules DaE-7 dépendantes de l'EPO a donc été évaluée grâce à un test de viabilité cellulaire. Les sérums issus de souris non injectées ou injectées ont été dilués au 1/8 et ajoutés aux cellules DaE-7 en culture en présence de 10 mU/ml d'EPO recombinante Neorecormon<sup>TM</sup>. Après 48 heures d'incubation, la viabilité cellulaire des cellules DaE-7 a été déterminée grâce à un test de prolifération.

Aucune différence significative n'a été observée sur la croissance des cellules DaE-7 en présence de sérums issus de souris injectées avec 2.5 µg de plasmide formulé par rapport aux sérums issus de souris naïves. Au contraire, une inhibition drastique de la croissance des cellules DaE-7 a été observée en présence de sérums provenant de souris anémiques injectées avec 10 µg de plasmide formulé. Cette observation confirme bien l'hypothèse selon laquelle des anticorps neutraliseraient l'EPOm chez les souris anémiques 50 jours après l'injection.

En général, en cas d'anémie, le taux de réticulocytes s'élève dans le sang (environ 3 à 4 jours après une hémorragie, par exemple) et la production d'érythrocytes augmente, on qualifie l'anémie de régénérative. En effet, la capacité de l'érythropoïèse chez une souris anémique est normale, un mécanisme compensatoire (correspondant à la stimulation de la production d'EPO qui elle-même induit la production de nouveaux érythrocytes) est mis en place. Ceci se traduit donc par un taux de réticulocytes circulants augmenté. Afin de caractériser l'anémie observée chez les souris Swiss anémiques injectées avec 10 µg de pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3%, nous avons mesuré le taux de réticulocytes circulants chez ces souris 50 jours après le transfert de gène (Figure 38). Rappelons que le réticulocyte est un jeune globule rouge qui séjourne un jour dans le sang périphérique. Son cytoplasme ne contient plus de noyau, mais des polyribosomes. Par coloration spécifique de l'ARN au thiazole orange, nous avons pu évaluer la proportion d'érythrocytes dans la population totale de globules rouges.



**Figure 38-Mesure du taux de réticulocytes après transfert de gène dans le muscle squelettique de souris.**

L'hématocrite de souris Swiss injectées (barre pleine) ou non (barre vide) avec 10 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol à 3% a été évalué 50 jours après l'injection intramusculaire.

Chez ces mêmes souris, le pourcentage de réticulocytes a été mesuré (cercles) 50 jours après l'injection intramusculaire. Au moins 4 animaux ont été inclus par groupe expérimental. L'astérisque indique une différence significative avec \*\*\*  $p < 0,001$  entre l'hématocrite et le pourcentage de réticulocytes des souris injectées avec 10 µg de pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3% par rapport aux souris non injectées.

Sur ce graphique, nous pouvons observer que la valeur moyenne d'hématocrite des souris contrôles est comprise aux alentours de 50% et la valeur normale du taux de réticulocytes circulant mesurée est proche de 3%. Les souris injectées avec 10 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé présentent un hématocrite significativement abaissé par rapport aux souris contrôles non injectées, 50 jours après injection. Chez ces souris anémiques, le pourcentage de réticulocytes est également fortement diminué (0.35 +/-0.15%) par rapport aux souris contrôles.

Ces résultats sont très importants pour la compréhension des mécanismes mis en place chez les souris Swiss après transfert du gène codant l'EPOm à l'aide des copolymères à blocs. Cinquante jours après le transfert de gène (10 µg/muscle formulé avec le Lutrol 3%), le muscle produit et sécrète la protéine recombinante (Figure 32) qui normalement devrait aller se fixer sur ses récepteurs spécifiques présents à la surface de cellules progénitrices de la moelle osseuse pour stimuler leur multiplication et leur maturation en réticulocytes puis en érythrocytes. Cependant, la mesure du taux de réticulocytes circulants semble indiquer que l'EPO sécrétée n'est plus fonctionnelle *in vivo* car elle ne permet pas de stimuler la production de nouveaux érythrocytes, l'anémie est donc caractérisée de non régénérative.

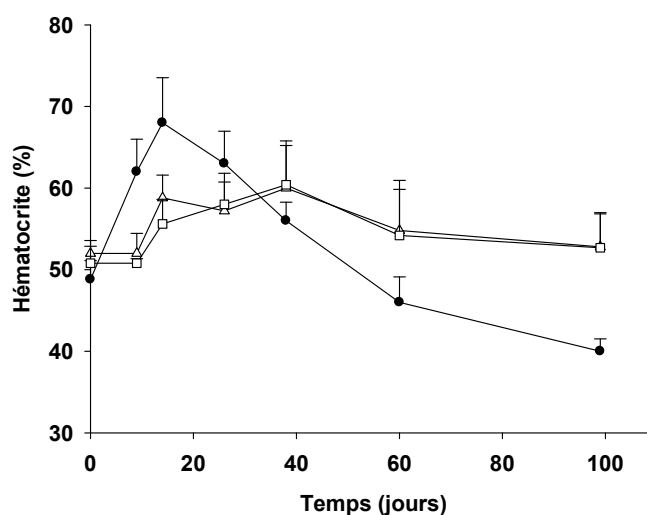
*En conclusion, le transfert de gène dans le muscle squelettique de souris Swiss immunocompétente à l'aide de formulations contenant 10 µg du plasmide pCMV-mEPO et le lutrol 3% induirait une anémie auto-immune caractérisée par la présence d'anticorps neutralisants non seulement dirigés contre l'EPO recombinante issue du transfert de gène mais aussi contre l'EPO endogène. Au contraire, des injections intramusculaires de quantités plus faibles d'ADN formulé (2,5 et 5 µg de plasmide/muscle), permettant une élévation plus modeste du taux d'hématocrite et une réponse inflammatoire moindre, ne provoque pas d'anémie auto-immune chez la souris Swiss.*

### ***Absence d'anémie auto-immune après transfert de gène chez la souris Swiss.***

Les résultats précédents suggèrent que l'inflammation engendrée dans le muscle 7 jours après l'injection de 10 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3% (Figure 34) associée à une forte quantité de protéines synthétisées (Tableau 4) seraient deux événements impliqués et limitants dans la mise en place de l'anémie auto-immune. Afin d'éviter la mise en place de cette anémie auto-immune chez la souris Swiss immunocompétente, nous avons étudié des protocoles de transfert de gènes consistant à créer artificiellement un intervalle de temps suffisant entre l'injection intramusculaire et l'expression du transgène.

#### **• Inhibition traductionnelle de l'ARNm EPOm par ARN interférence.**

La première stratégie étudiée a consisté à co-injecter, dans les muscles tibiaux antérieurs de souris Swiss, 10 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé et en absence ou en présence de différentes quantités de siRNA dirigé contre l'EPOm (Figure 39). L'utilisation de siRNA anti-EPO capables d'inhiber la traduction de l'ARNm en protéine permettrait de limiter et de retarder la sécrétion d'EPO par le muscle squelettique pendant la phase accrue d'inflammation observée après injection de 10µg de plasmide formulé chez les souris Swiss (Figure 34).



**Figure 39-Suivi du taux d'hématocrite après transfert de gène et de siRNA dans le muscle squelettique de souris Swiss.**

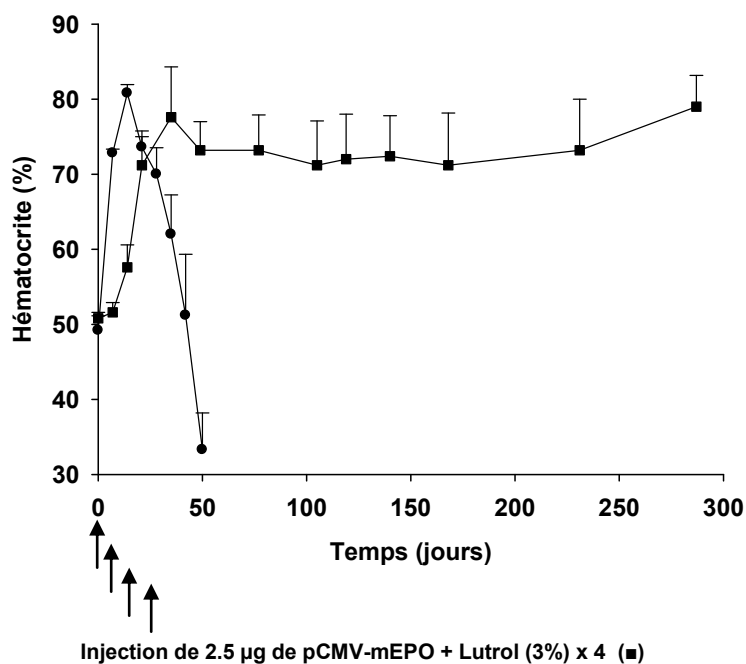
L'hématocrite de souris Swiss, injectées avec 10 µg du plasmide pCMV-mEPO seul (●) ou en présence de 250 (△) ou 500 (□) ng de siRNA, formulé avec le Lutrol à 3%, a été évalué à différents temps après l'injection intramusculaire. Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental.

Sur cette figure, nous observons que l'augmentation du taux d'hématocrite des souris est décalée de 7 jours lorsque le plasmide est injecté en présence de 250 ou 500 ng de siRNA par rapport à l'injection du plasmide seul formulé avec le Lutrol 3%. Durant les 7 premiers jours qui suivent l'injection IM, les siRNA co-injectés avec le plasmide ont donc permis de retarder la sécrétion de l'EPOm par inhibition de la traduction de l'ARNm correspondant.

Contrairement aux souris injectées avec 10 µg de plasmide formulé, aucune anémie autoimmune n'a été mise en évidence chez les souris injectées avec la même formulation en présence de siRNA. Nous avons cependant observé que la valeur moyenne maximale du taux de l'hématocrite des souris injectées avec les siRNA, était plus faible que celle des souris injectées en absence de siRNA. La sécrétion importante d'EPO par des fibres musculaires transfectées, lésées puis détruites au bout de 7 jours après injection concourrait à une élévation précoce du taux d'hématocrite détectable uniquement chez les souris injectées avec 10 µg de plasmide formulé seul.

#### • Décalage entre inflammation et sécrétion d'EPO grâce à un protocole d'injections multiples

L'injection d'une quantité minimale de 2,5 µg de plasmide pCMV-mEPO formulé par muscle a permis d'obtenir un effet significatif sur le taux d'hématocrite par rapport à une souris contrôle sans pour autant induire de réponse inflammatoire musculaire (Figure 34). Forts de ces résultats, nous avons réalisé une série de 4 injections successives de 2.5 µg de plasmide formulé dans le muscle squelettique de souris Swiss avec un intervalle d'une semaine entre chaque injection (Figure 40).



**Figure 40-Suivi du taux d'hématocrite après multi-injections du gène codant l'EPO murine dans le muscle squelettique de souris Swiss.**

L'hématocrite de souris Swiss, injectées avec 10 (●) ou 4 fois 2.5 µg (■) du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol à 3%, a été évalué à différents temps après l'injection intramusculaire. Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental.

Contrairement à ce qui est observé chez les souris injectées avec 10 µg de plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3%, les souris injectées 4 fois avec 2.5 µg de plasmide formulé ont un taux d'hématocrite stable pendant au moins 300 jours. La valeur d'EPO sérique de ces souris est de 67.2 +/- 20.8 mU/ml 288 jours après l'injection.

Une production et une sécrétion progressive d'EPOm obtenue après une série de 4 injections de 2.5 µg de plasmide formulé permettrait donc d'éviter l'apparition d'une anémie autoimmune chez la souris Swiss immunocompétente. Ce protocole d'injection efficace pour suivre l'effet biologique ou thérapeutique de l'EPO sur le long terme, nous a permis d'étudier le transfert du gène codant l'EPO murine dans un modèle de souris en insuffisance rénale chronique.

### **Correction du phénotype anémique après transfert de gène codant l'EPOm dans un modèle de souris en IRC**

#### **• Mise au point du modèle de souris en insuffisance rénale chronique (IRC)**

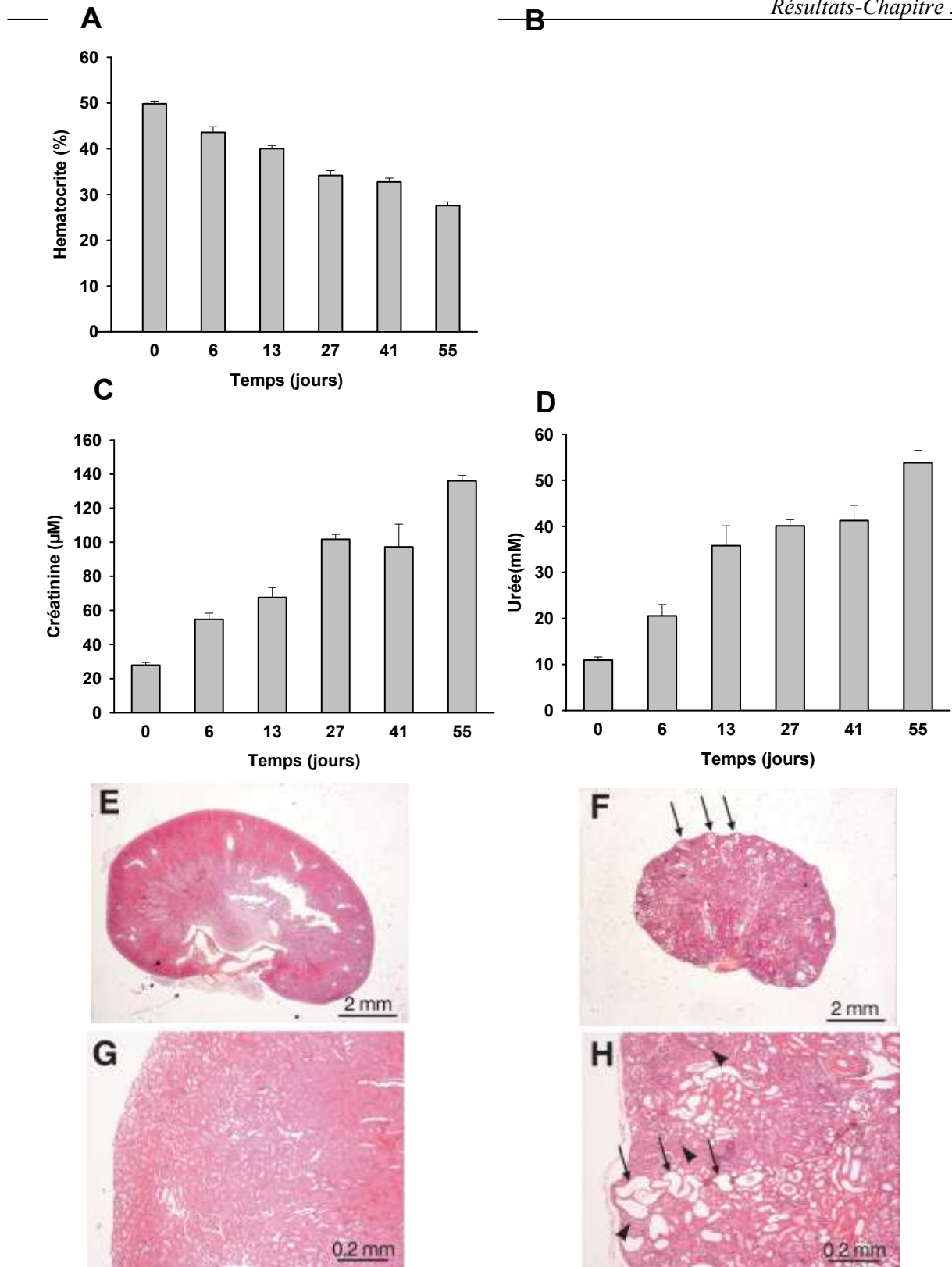
Yokozawa et al., ont été les premiers à décrire un modèle de rat en insuffisance rénale chronique obtenu avec un traitement alimentaire composé à 0,75 % en adénine (Yokozawa et al., 1986). Ce modèle est caractérisé par l'apparition de lésions au niveau des tubules et des glomérules rénaux. *In vivo*, l'enzyme adénine phosphorylboasil transférase convertit l'adénine en adénine monophosphate, qui présent en excès devient le substrat de la xanthine deshydrogenase et est oxydé en 2,8

dihydroxyadenine (DHA) (*Wyngaarden et Dunn, 1957*). Ce composé précipite sous forme de cristaux dans l'interstice rénal et provoque la destruction des reins (*Greenwood et al., 1982*). L'administration de 0,5 % d'adénine dans la ration alimentaire des souris a provoqué le décès des souris au bout de une à deux semaines. En dessous de 0,1% d'adénine dans l'alimentation des souris, celles-ci n'ont pas développé d'insuffisance rénale (résultats obtenus par le Dr. PAYEN). En revanche, l'administration d'une dose de 0,25% d'adénine dans l'alimentation nous a permis d'élaborer un modèle unique de souris en IRC.

L'administration d'une dose de 0,25 % en adénine dans l'alimentation des souris a induit une diminution progressive du taux d'hématocrite et du poids, alors qu'une augmentation des taux de créatinine et d'urée plasmatiques a été mesurée (Figures 41 A à D). Chez les souris traitées avec l'adénine à 0,25 %, nous pouvons observer une histologie rénale anormale avec une réduction de la taille des reins par rapport à des souris normales (Figures 41 E et F), une forme irrégulière du cortex rénal (Figure 41F) et une dilatation importante des tubules (Figure 41H) matérialisées par les flèches. Sur la figure 41H, nous pouvons aussi observer des infiltrats de cellules inflammatoires autour des tubules dilatés (pointes noires). Aucune différence morphologique au niveau des glomérules et des vaisseaux sanguins n'a pu être mise en évidence entre les souris traitées à l'adénine et les souris normales.







**Figure 41**—Caractérisation du modèle de souris en IRC.

L'hématocrite (A), le poids (B), le taux d'urée (C) et de créatinine (D) plasmatiques ont été évalués chez la souris à différents temps après le début du traitement à l'adénine (0,25%). Vue microscopique de reins représentative de souris normales (E et G) ou de souris traitées à l'adénine à 0,25% (F et H) 40 jours après le début du traitement. Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental.

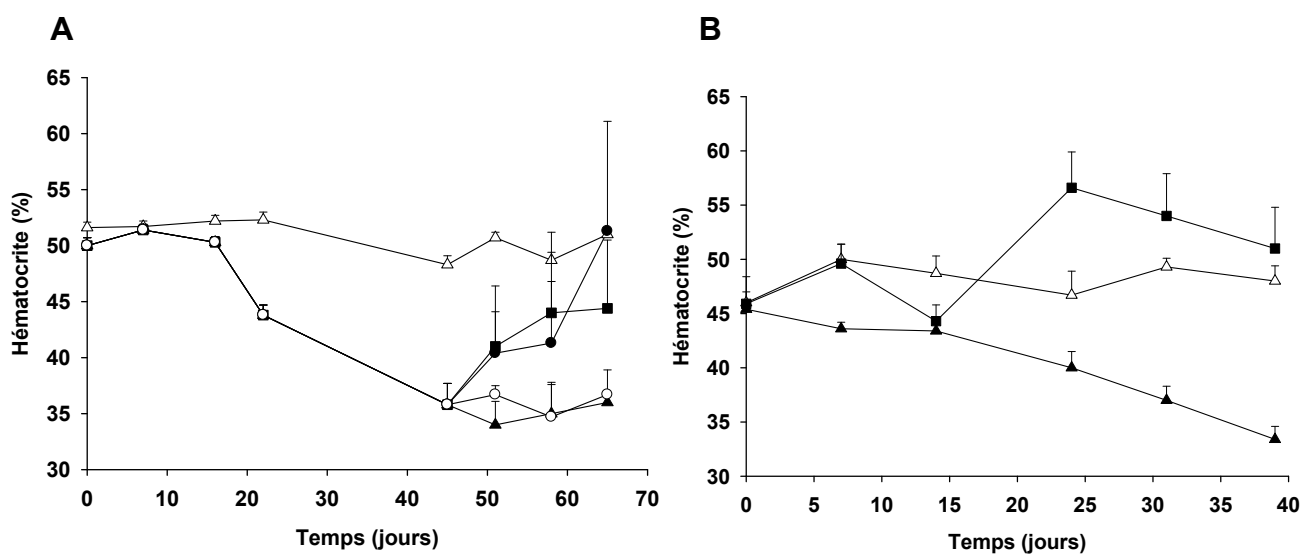
• Transfert du gène pCMV-mEPO dans le muscle squelettique de souris en IRC

Dans ce modèle de souris développant une anémie acquise consécutive au traitement avec l'adénine à 0,25%, nous avons évalué l'efficacité du transfert du gène codant l'EPOm à l'aide du Lutrol 3%

Pour cela, deux stratégies ont été développées :

-Une première stratégie de thérapie génique thérapeutique a consisté à induire l'insuffisance rénale chez des souris Swiss avec l'adénine, et l'injection intramusculaire du plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol à 3% a été réalisée seulement une fois l'anémie installée (après 42 jours de traitement) (Figure 42A).

-Dans un contexte de thérapie génique préventive, les injections intramusculaires ont été réalisées au début du traitement avec l'adénine et l'évolution du taux d'hématocrite a été suivie en fonction du temps (Figure 42B).



**Figure 42-Suivi du taux d'hématocrite après transfert du gène codant l'EPO murine dans le muscle squelettique de souris Swiss traitées à l'adénine 0,25%.**

Les souris ont été injectées avec l'ADN quand l'hématocrite atteint 35 % (A) ou simultanément avec le début du traitement à l'adénine 0,25% (B).

(A) Au bout de 45 jours de traitement avec l'adénine à 0.25%, les souris ont été injectées avec 10 µg de pCMV-mEPO reverse (○), 2.5 (■) ou 10 µg (●) de plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol à 3% et ont été traitées à l'adénine jusqu'à la fin de l'expérience. Cinq souris non injectées ont été traitées avec l'adénine (▲) et les souris contrôle ont reçu une alimentation dépourvue d'adénine (△).

(B) Dix souris ont été traitées avec l'adénine 0,25% pendant 40 jours (▲). Dix souris ont été traitées avec l'adénine 0,25% jusqu'à la fin de l'expérience et injectées avec 2x2.5 µg de plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3% (■). Les deux injections ont été réalisées à temps j0 et j14. Les souris contrôle ont reçu une alimentation dépourvue d'adénine (△).

Au moins 10 animaux ont été inclus par groupe expérimental.

Le plasmide pCMV-mEPOreverse contenant la séquence cDNA de l'EPO murine inversée par rapport au promoteur a été utilisé tant que contrôle négatif. L'injection de 10 µg de plasmide pCMV-mEPOreverse formulé avec le Lutrol 3% réalisé chez les souris après 45 jours de traitement à l'adénine n'a pas permis la correction du phénotype anémique (Figure 42A). Les résultats indiquent en

effet, que la valeur moyenne d'hématocrite de ces souris est comprise entre 34% et 37% environ à partir du 45<sup>ème</sup> de traitement, au même titre que les souris traitées à l'adénine 0,25 % et non injectées.

Par contre l'injection de 10 µg de plasmide pCMV-mEPO formulé chez les souris traitées à l'adénine a permis une élévation du taux d'hématocrite qui se stabilise autour de sa valeur basale (50% environ) au jour 65 (Figure 42A). L'injection de 2.5 µg du plasmide pCMV-mEPO formulé a également permis une amélioration mais plus modeste du phénotype anémique (Figure 42A).

Au cours de la seconde étude, les souris ont été injectées avec le plasmide pCMV-mEPO formulé au début du traitement avec l'adénine (Figure 42B). Deux injections (à J0 et J14) de 2.5 µg de pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3% ont été réalisées de façon à ajuster la quantité de protéines EPO nécessaire et à éviter la mise en place d'une anémie autoimmune pendant toute la durée de l'expérimentation. Dans ces conditions de transfection, l'hématocrite des souris traitées à l'adénine 0,25% s'est maintenu proche des valeurs normales pendant au moins 40 jours. Au contraire, l'hématocrite des souris traitées avec l'adénine et non injectées a diminué progressivement pour atteindre 32 % au bout de 40 jours de traitement. La mortalité engendrée par le traitement à l'adénine ne nous a pas permis d'étudier les effets du transfert de gène sur des temps plus longs.

Quarante jours après le début d'un traitement avec l'adénine à 0,25%, la mesure du taux de réticulocytes circulants a également été réalisée chez des souris Swiss traitées à l'adénine et injectées 2 fois avec 2.5 µg de plasmide formulé (Tableau 5).

	Hématocrite (%)	Réticulocytes (%)
<b>contrôle</b>	52,0 +/- 2,4	3,59 +/- 0,04
<b>adénine 0,25%</b>	27,0 +/- 4,0	1,62 +/- 0,3
<b>adénine 0,25% + 2x2.5µg pCMV-mEPO + 3%Lutrol</b>	59,3 +/- 6,3	2,09 +/- 0,3

**Tableau 5 – Détermination de l'hématocrite et du pourcentage de réticulocytes chez les souris en IRC après transfert de gène dans le muscle squelettique.**

*Les mesure du taux d'hématocrite et du pourcentage de réticulocytes circulants ont été réalisées chez de souris contrôles non traitées à l'adénine et non injectées, de souris traitées à l'adénine 0,25% pendant 40 jours et injectées ou non avec 2 fois 2.5 µg de plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3%. Au moins 3 animaux ont été inclus par groupe expérimental.*

Ces résultats suggèrent fortement que chez les souris traitées à l'adénine et injectées avec le plasmide, le nombre absolu de réticulocytes serait augmenté approximativement d'un facteur 3 par rapport aux souris anémiques non injectées. Ces résultats sous-entendent que l'injection du plasmide pCMV-mEPO formulé chez les souris en IRC permet bien une correction du phénotype anémique par production d'EPOm recombinante et stimulation de l'érythropoïèse.

De façon à étudier l'effet du transfert de gène non viral de l'EPOm sur la fonction rénale, nous avons déterminé les valeurs de créatinine et d'urée plasmatiques chez les souris en IRC de la Figure 48B (Tableau 6).

	Créatinine ( $\mu\text{M}$ )	Urée (mM)
contrôle	16,2 +/- 1,6	6,2 +/- 0,3
adénine 0,25%	87,2 +/- 13,3	54,5 +/- 8,8
adénine 0,25% + 2x2.5 $\mu\text{g}$ pCMV-mEPO + 3%Lutrol	76,4 +/- 21,6	68,6 +/- 10,5

**Tableau 6– Détermination des concentrations de créatinine et d'urée plasmatiques chez les souris en IRC après transfert de gène dans le muscle squelettique.**

Les concentrations de créatinine et d'urée plasmatiques ont été déterminées chez les souris contrôles non traitées à l'adénine 0,25%, chez les souris non injectées et traitées à l'adénine 0,25% pendant 40 jours et les souris traitées à l'adénine 0,25 % pendant 40 jours et injectées avec 2 fois 2.5  $\mu\text{g}$  de plasmide pCMV-mEPO formulé avec le Lutrol 3%. Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental.

Ce tableau montre que les souris traitées à l'adénine 0,25% présentent des valeurs plasmatiques d'urée et créatinine significativement augmentées par rapport aux souris contrôles, ce qui définit l'insuffisance rénale chronique. Les résultats indiquent également que le transfert de gène codant l'EPO murine à l'aide du Lutrol 3% permet la correction du phénotype anémique, mais ne permet pas la correction de la fonction rénale altérée par l'administration de l'adénine à 0,25% dans l'alimentation des souris.

Les travaux présentés dans ce chapitre nous ont permis de montrer que l'injection intramusculaire d'une dose de 10 $\mu\text{g}$ /muscle du gène codant l'EPO murine à l'aide de copolymères à blocs dans le muscle squelettique induisait l'apparition d'un effet secondaire inattendu chez la souris Swiss immunocompétente. Les résultats obtenus suggèrent qu'il s'agit d'une anémie auto-immune non régénérative avec apparition d'anticorps neutralisants dirigés contre l'EPO recombinante issue du transfert de gènes et contre l'EPO endogène des souris. Les mécanismes impliqués dans l'apparition de ces anticorps n'ont pas pu être directement identifiés mais nous suspectons fortement l'implication d'une réponse inflammatoire dépendante de la quantité d'ADN injectée associée à une forte production de la protéine. Parmi les différentes stratégies conçues pour prévenir l'apparition de l'anémie auto-immune chez la souris Swiss, nous avons montré que l'utilisation d'un protocole d'injection sûr et simple consistant en des injections répétées de faibles quantités d'ADN formulé avec les copolymères à blocs était la plus efficace. Une modulation fine de la sécrétion d'EPO ainsi obtenue associée à une réponse inflammatoire limitée permettrait d'empêcher la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique de type humorale et permettrait ainsi d'obtenir un effet biologique de l'EPO sur le long terme. Ce protocole de multi-injections s'est révélé particulièrement efficace pour la correction de l'anémie acquise dans un modèle de souris en insuffisance rénale chronique.

## Chapitre 3.

# Régulation de la sécrétion de protéines à partir du muscle squelettique après transfert de gène.

Dans le contexte du transfert de gène de l'EPO, il serait préférable de disposer d'un système de régulation temporelle de l'expression du gène. Le risque déjà élevé d'hypertension artérielle et de thrombose chez les patients en insuffisance rénale ne doit pas être amplifié par l'administration de la protéine thérapeutique. La maîtrise de l'expression génique est une question très actuelle de la thérapie génique, qu'elle soit virale ou non virale. Dans la majorité des essais, le gène thérapeutique est sous contrôle d'un promoteur fort, de type CMV, provoquant une expression continue et non régulée du gène. Lors du transfert de gène codant l'EPOm, nous avons observé dans le muscle squelettique une expression stable à long terme après plusieurs injections d'ADN formulé avec les copolymères à blocs chez la souris. En vue d'une application clinique, cette expression continue peut s'avérer gênante, il serait donc préférable de pouvoir contrôler le niveau et le moment de l'expression afin et pour des raisons de sécurité de pouvoir arrêter le traitement en cas d'effets secondaires non désirables. Le système de régulation idéal doit remplir de nombreux critères, en particulier un faible niveau basal associé à une induction élevée, une absence d'interférence avec les systèmes endogènes, une activation par un inducteur exogène non toxique de pharmacologie connue, un effet dépendant de la dose, un caractère réversible, et enfin une facilité d'usage (voir partie 4 de l'Introduction). De nombreux systèmes inductibles ont été mis au point pour réguler artificiellement un gène au niveau transcriptionnel. Parmi toutes les stratégies, les systèmes de régulation par la tétracycline sont les plus couramment utilisés car ils sont très efficaces et parce que la pharmacologie de la tétracycline (ou de son analogue, la doxycycline) est bien connue. Le système initial Tet-Off développé par Gossen et Bujard permet une régulation efficace mais l'expression du gène est obtenue en absence de tétracycline (d'où son nom Tet-Off) (*Gossen et Bujard., 1992*). Ce système nécessite l'administration continue de tétracycline et l'induction dépend de l'élimination de ce répresseur. Une version alternative Tet-On a été développée, basée sur une forme mutée du transactivateur tTA, nommée rtTA (reverse tTA) qui se lie à l'ADN en présence de l'inducteur. Dans le système Tet-on, l'addition de la molécule inductrice entraîne l'expression du transgène, alors que sa répression dépend de l'élimination de la molécule. La principale limitation du système Tet-On dans un contexte de thérapie génique est sa mauvaise cinétique d'induction et son fort niveau d'expression basal. Des modifications récentes ont été apportées au système incluant un nouveau transactivateur rtTA2S-M2 qui permet un contrôle plus strict de l'expression d'un gène (*Urlinger et al., 2000*).

Le but de du projet détaillé ci-après était d'étudier, à l'aide des copolymères à blocs, le transfert du gène codant l'EPO murine sous la dépendance du système de régulation Tet-On (version modifiée rtTA2s-M2) dans le muscle squelettique de souris.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *The Journal of Gene medicine* :

**Inducible production of erythropoietin using intramuscular injection of block copolymer/DNA formulation.**

Richard P, Pollard H, Lanctin C, Bello-Roufai M, Desigaux L, Escande D, Pitard B. *J Gene Med.* 2005 Jan;7(1):80-6.

***Sécrétion inductible d'érythropoïétine après transfert de gène dans le muscle squelettique.***

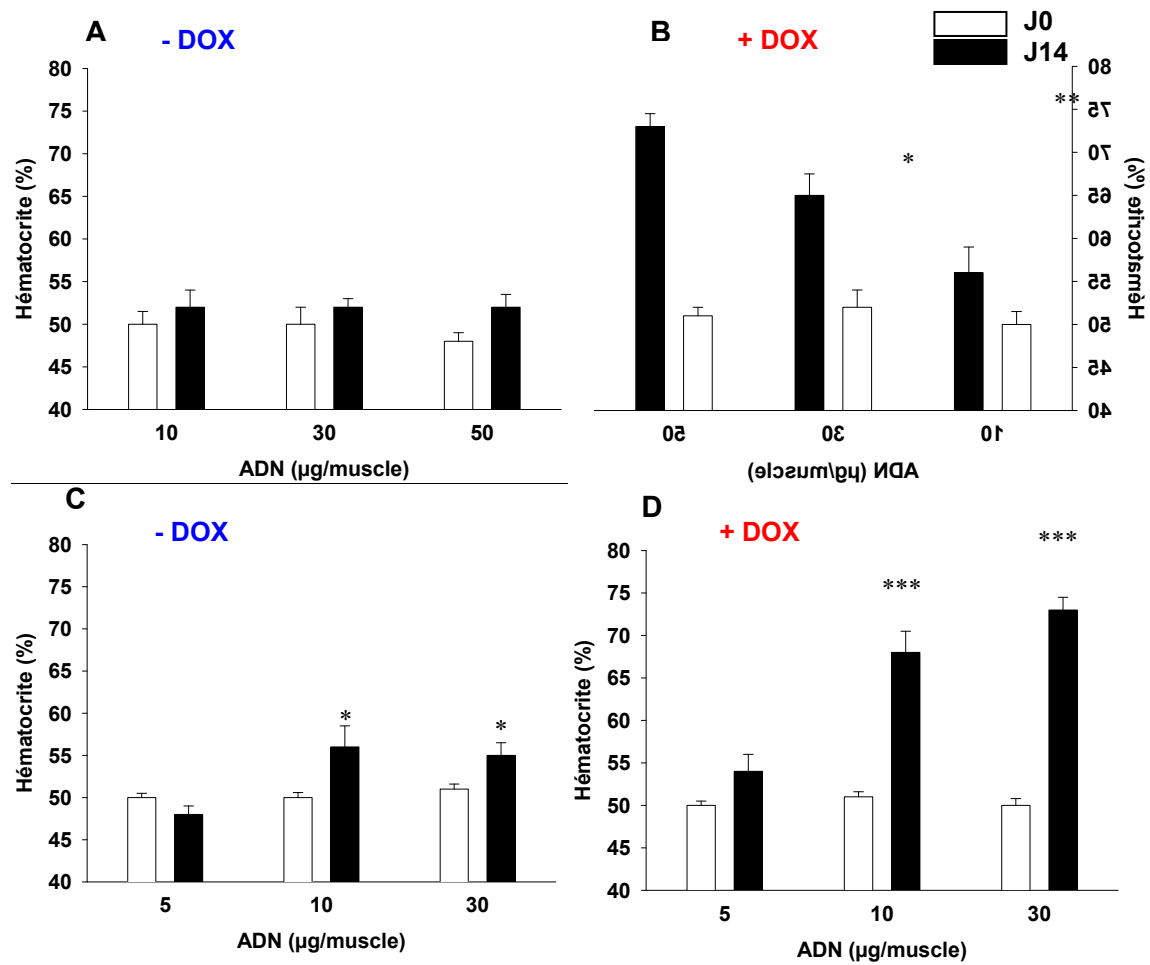
Au cours de cette étude, nous avons utilisé un plasmide pTet-o-mEPO codant l'EPO murine sous la dépendance du facteur de transcription rtTA2<sup>S</sup>-M2 dont l'activité est régulée par un antibiotique, la doxycycline. Le plasmide pTet-o-mEPO code de façon constitutive le transactivateur rtTA2<sup>S</sup>-M2 sous le contrôle d'un promoteur fort CAG. Le transactivateur est composé d'une version mutée du répresseur tetR et des domaines minimaux d'activation de la protéine VP-16 d'HSV (*Urlinger te al., 2000*). C'est seulement en présence de doxycycline que le transactivateur va se fixer sur sa séquence opératrice située en amont du gène codant l'EPOm pour induire son expression. Après avoir testé le plasmide pTet-o-mEPO *in vitro* (données non présentées), nous nous sommes intéressés à son efficacité *in vivo* pour le transfert de gène codant l'EPOm à l'aide de copolymères à blocs dans le muscle squelettique de souris Swiss immunocompétentes.

Nous avons tout d'abord déterminé les quantités minimales de plasmide à injecter pour obtenir un effet thérapeutique. Pour cela, nous avons injecté dans le tibia antérieur de souris Swiss différentes quantités de plasmide seul ou en présence de PE6400 à 0.05% et nous avons évalué l'efficacité du transfert de gène 14 jours après l'injection en mesurant le taux d'hématocrite. L'expression du gène codant l'EPO murine a été induite en administrant aux souris la doxycycline dans l'eau de boisson (Figure 43).

Nous avons observé qu'en absence de doxycycline, les souris injectées avec 10, 30 ou 50 µg de plasmide pTet-o-mEPO ne présentaient aucune élévation du taux d'hématocrite 14 jours après l'injection intramusculaire (Figure 43A). En revanche, en présence de doxycycline dans l'eau de boisson, les souris injectées avec le plasmide pour des quantités égales ou supérieures à 30 µg/muscle ont présenté un taux d'hématocrite significativement augmenté 14 jours post-injection (Figure 43B). Lorsque les souris ont été injectées avec 10 ou 30 µg de plasmide formulé et, non traitées à la doxycycline, leur taux d'hématocrite a légèrement augmenté au bout de 14 jours (Figure 43C). Le gène codant l'EPO murine est donc été exprimé même en absence d'inducteur, ceci peut s'expliquer par la fixation non spécifique du transactivateur sur sa séquence opératrice. Ce phénomène de fuite correspondant à l'activité basale a été observé au delà d'un certain niveau de transfection puisque les souris injectées avec 5 µg de plasmide formulé ont une valeur d'hématocrite normale. Par contre, en présence de doxycycline, l'hématocrite des souris injectées avec 10 ou 30 µg de plasmide formulé a drastiquement augmenté pour atteindre un niveau moyen maximum de 75% environ (Figure 43D).

Les doses minimales d'ADN nécessaires pour obtenir un effet significatif sur le taux d'hématocrite des souris Swiss ont donc été définies et sont de 30µg pour l'ADN nu et 10µg pour l'ADN formulé avec le PE6400 à 0.05%.

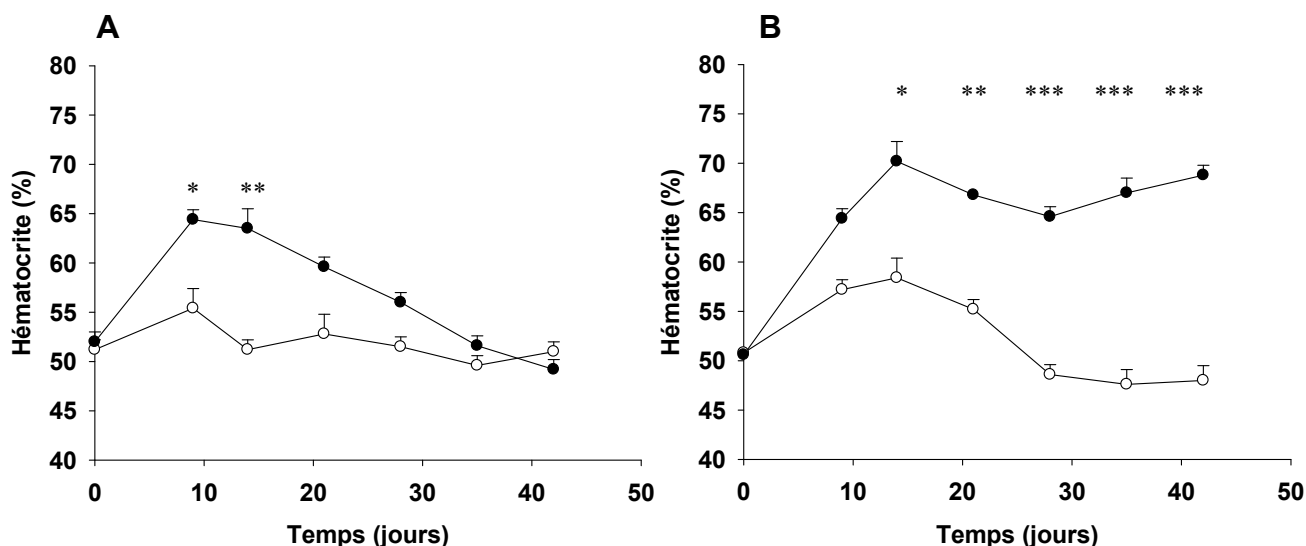




**Figure 43-Suivi du taux d'hématocrite après transfert du gène dans le muscle squelettique de souris traitées ou non à la doxycycline.**

L'hématocrite des souris a été mesuré avant injection (barres vides) ou 14 jours après injection (barres pleines) de quantités croissantes de plasmide pTet-O-mEPO seul (A, B) ou formulé avec le PE6400 à 0.05% (C, D) dans le tibial antérieur de souris traitées (B, D) ou non (A, C) avec la doxycycline dans l'eau de boisson tout au long de l'expérience. Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental. Les astérisques indiquent les différences significatives avec \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,001$  entre les souris avant et 14 jours après injection intramusculaire.

L'injection intramusculaire de 30 µg de plasmide nu chez les souris traitées à la doxycycline, a permis une élévation transitoire du taux de l'hématocrite (Figure 44A). Au bout 42 jours, le taux de l'hématocrite a retrouvé une valeur de base. En revanche, le taux d'hématocrite des souris injectées avec 10 µg de plasmide formulé avec le PE6400 est resté stable (proche de 70%) pendant au moins 42 jours (Figure 44B).



**Figure 44-Suivi du taux d'hématocrite après transfert du gène dans le muscle squelettique de souris.**

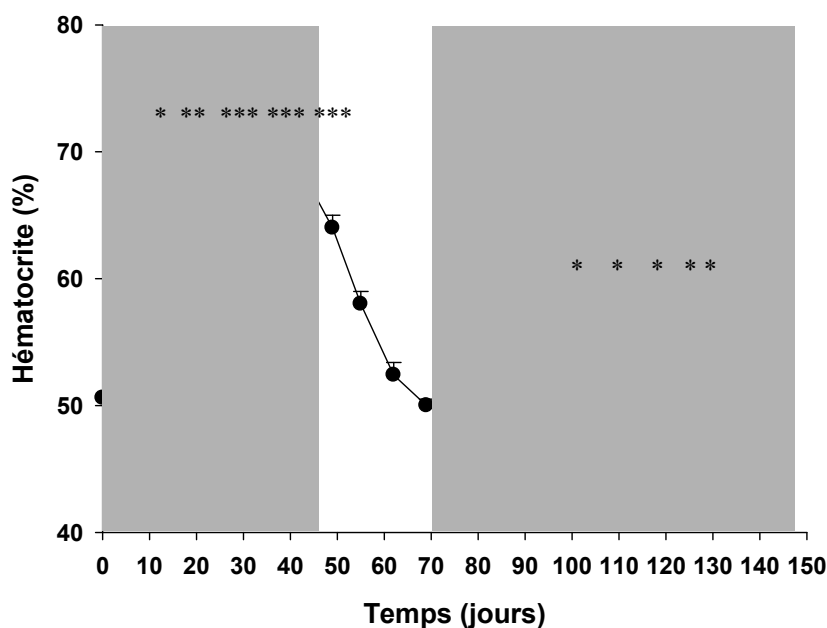
Les souris ont été injectées avec 30 µg de plasmide pTet-o-mEPO seul (A) ou 10 µg de plasmide formulé avec le PE6400 à 0.05% (B). Immédiatement après l'injection intramusculaire, les souris ont reçu (●) ou non (○) la doxycycline dans l'eau de boisson. Au moins 5 animaux ont été inclus par groupe expérimental. Les astérisques représentent les différences significatives avec \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,001$  entre les souris traitées ou non à la doxycycline.

Ces résultats sont surprenants car les travaux précédemment décrits avec le plasmide pCMV-mEPO qui code l'EPOm de façon constitutive ont montré que l'injection IM de 10 µg d'ADN formulé induit une chute brutale du taux de l'hématocrite dès 14 jours avant d'atteindre une valeur inférieure à la valeur basale 50 jours après l'injection (apparition d'une anémie autoimmune).

Sur la figure 44B, nous pouvons observer que les souris injectées avec 10 µg du plasmide pTet-o-mEPO codant l'EPOm de façon inducible ne présentent pas de chute du taux d'hématocrite au moins pendant 42 jours. Cette stabilité du taux d'hématocrite chez les souris injectées avec le plasmide pTet-o-mEPO formulé pourrait s'expliquer par une activation plus lente de l'expression et/ou une expression plus faible d'EPO. Ce phénomène pourrait être dû à la doxycycline qui nécessite d'être distribuée à l'ensemble de tissu musculaire pour agir sur le transactivateur et/ou à l'activation et la fixation du transactivateur rtTA2s-M2 sur sa séquence opératrice placée en amont du gène codant l'EPO murine.

### Régulation de l'expression du transgène par la doxycycline après transfert de gène dans le muscle squelettique

L'obtention d'une valeur stable du taux d'hématocrite dans le temps après injection IM de 10 $\mu$ g du plasmide pTet-o-mEPO formulé, nous a permis d'étudier l'efficacité de ce système de régulation sur le long terme en réalisant plusieurs cycles d'induction et d'extinction de l'expression du gène codant l'EPOm (Figure 45).



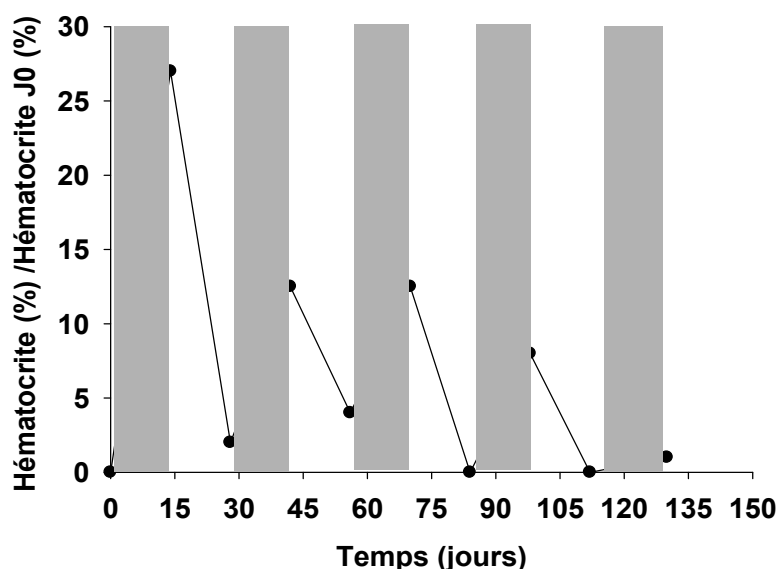
**Figure 45-Régulation du taux d'hématocrite après transfert du gène dans le muscle squelettique de souris.**

L'hématocrite des souris injectées avec 10  $\mu$ g de plasmide pTet-o-mEPO formulé avec le PE6400 à 0.05% et traitées avec la doxycycline (partie grisée) ou non (partie claire) a été déterminé à différents après l'injection. Les astérisques représentent la différence significative avec \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,001$  entre les souris traitées ou non à la doxycycline (non représentées sur ce graphique).

Sur cette figure, nous observons que l'hématocrite des souris injectées avec 10  $\mu$ g de plasmide formulé et traitées à la doxycycline est stable (environ 70%) jusqu'au jour 42. A partir de ce jour, la doxycycline a été retirée de l'eau de boisson des souris, la valeur de l'hématocrite a alors brutalement diminuée pour retrouver son niveau basal au jour 70. A partir du moment où la doxycycline a été retirée, l'hématocrite a mis environ 28 jours pour retrouver sa valeur basale. Cette diminution du taux d'hématocrite correspond bien à la durée de demi-vie des érythrocytes qui est de 24 jours.

Au jour 70, un second cycle d'induction de l'expression génique a été réalisé en administrant à nouveau la doxycycline aux souris. Le taux d'hématocrite des souris traitées a alors augmenté en conséquence mais a atteint une valeur maximale seulement de 60% environ. A partir du jour 132, nous pouvons observer que la présence de doxycycline n'a plus aucun effet, sûrement sur l'expression du gène de l'EPO, et donc sur le taux d'hématocrite que nous mesurons.

Une autre expérience a montré qu'une injection intramusculaire de 10 µg de plasmide pTet-o-mEPO formulé avec le PE6400 à 0.05% n'a permis de réaliser qu'une série de 4 cycles induction/extinction : au bout du 5<sup>ème</sup> cycle (130 jours après l'injection), plus aucun effet de la doxycycline n'a été observé sur le taux d'hématocrite des souris (Figure 46).



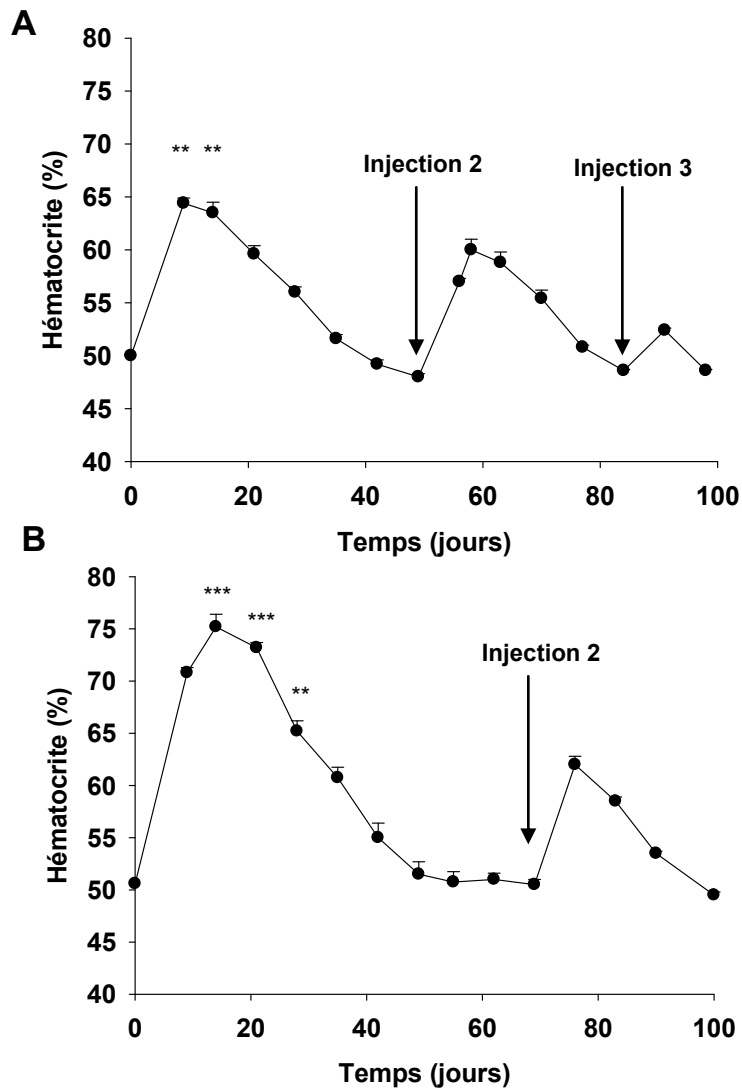
**Figure 46-Régulation du taux d'hématocrite après transfert du gène dans le muscle squelettique de souris.**

L'hématocrite des souris injectées avec 10 µg de plasmide pTet-o-mEPO formulé avec le PE6400 à 0.05% et traitées avec la doxycycline (partie grisée) ou non (partie claire) a été déterminé à différents temps après l'injection. Les valeurs représentent la variation relative de l'hématocrite au temps donné par rapport à l'hématocrite des souris mesuré avant injection intramusculaire.

### **Réaction immunitaire contre le transactivateur rtTA2s-M2.**

La perte d'efficacité de ce système de régulation dans le temps pourrait s'expliquer par la mise en place d'une réponse immunitaire. Des injections répétées de 30 µg de plasmide pTet-o-mEPO nu ou formulé avec le PE6400 à 0.05% ont alors été effectuées chez des souris Swiss immunocompétentes, et l'hématocrite a été mesuré à différents temps après injections intramusculaires (Figure 47). L'hématocrite des souris injectées une fois avec 30 µg de plasmide nu ou formulé avec le PE6400 a atteint un pic 14 jours après l'injection (65% pour l'ADN nu et 75 % pour l'ADN formulé), avant de chuter brutalement et d'atteindre une valeur basale au bout de 50 jours (Figures 47 A et B).

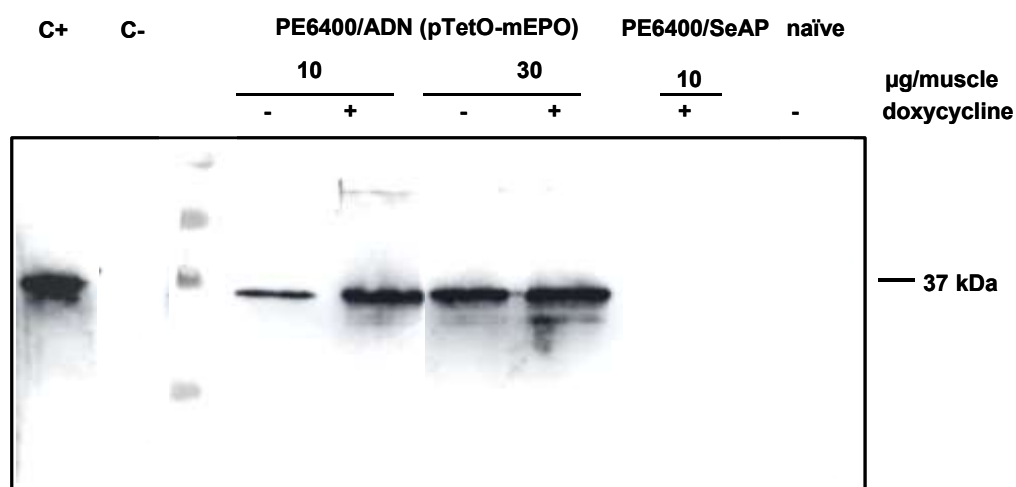
Après 2 nouvelles injections d'ADN nu à J50 et J85 (Figure 47A), ou après 1 nouvelle injection d'ADN formulé à J70 (Figure 47B), l'hématocrite des souris traitées à la doxycycline a augmenté mais de façon plus modeste qu'après la première injection. Cet hématocrite a effectivement chuté très rapidement avant de retrouver sa valeur basale. Nous n'avons pas observé d'anémie auto-immune chez ces souris. Ces résultats suggèrent donc la mise en place d'une réaction immunitaire préférentiellement dirigée contre les protéines chimériques du transactivateur d'origine virale et bactérienne.



**Figure 47-Régulation du taux d'hématocrite après transfert du gène dans le muscle squelettique de souris.**

L'hématocrite des souris traitées avec la doxycycline et injectées avec 30  $\mu$ g de plasmide pTet-o-mEPO seul (A) ou formulé avec le PE6400 à 0.05% (B) a été déterminé à différents temps après injections. Les différentes injections sont matérialisées par les flèches. Les astérisques représentent la différence significative avec \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,001$  entre les souris traitées ou non à la doxycycline (valeurs d'hématocrites non représentées sur ce graphique).

Afin de confirmer cette hypothèse, les sérums de souris Swiss injectées avec 10 ou 30  $\mu\text{g}$  du plasmide pTet-o-mEPO formulé avec le PE6400 à 0.05% ont été recueillis pour une analyse de Western-Blot (Figure 48).



**Figure 48-Réponse immunitaire humorale contre le transactivateur rtTA2s-M2 après transfert de gène chez la souris.**

La protéine Tet repressor (240 ng) a été mise à migrer dans un gel polyacrylamide et a été transférée sur membrane nitrocellulose. Cette membrane a été incubée avec le sérum de souris traitées ou non à la doxycycline et injectées avec 10 ou 30  $\mu\text{g}$  de plasmide pTet-o-mEPO formulé avec le PE6400 à 0.05%, avec le sérum de souris traitées à la doxycycline et injectées avec 10  $\mu\text{g}$  du plasmide pVR-SeAP formulé avec le PE6400 à 0.05%, ou avec le sérum de souris naïves non injectées. Après incubation une nuit à 4°C, la membrane a été incubée avec un anticorps anti-IgG de souris et a été révélée avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Le contrôle positif correspond à l'incubation de la membrane avec un anticorps de lapin anti-TetR purifié et le contrôle négatif à l'incubation de la membrane avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La masse moléculaire de la protéine TetR est de 37 kDa.

En réalisant cette expérience, nous avons révélé la présence d'anticorps dirigés contre la protéine purifiée TetR du transactivateur rtTA2s-M2 dans les sérums issus de souris injectées avec 10 ou 30  $\mu\text{g}$  de plasmide pTet-o-mEPO formulé, et ceci indépendamment de l'administration de la doxycycline aux souris. Aucun marquage n'a été révélé après incubation de la membrane avec les sérums récoltés chez des souris naïves ou injectées avec 10  $\mu\text{g}$  du plasmide pVR-SeAP formulé avec le PE6400 0.05%.

Ces travaux mettent en évidence l'intérêt d'utiliser les copolymères à blocs pour le transfert de gène codant l'EPOm sous la dépendance d'un système de régulation chimérique dans le muscle squelettique afin de limiter la quantité d'ADN à injecter, et par conséquent de limiter la réponse inflammatoire, rendant possible la régulation de l'expression du gène de l'EPOm pendant au moins 4 mois avant la mise en place d'une réponse immunitaire de type humorale dirigée contre le transactivateur rtTA2s-M2 chimérique. Nous suspectons également la mise en place d'une réponse immunitaire de type cellulaire à l'origine de la destruction des fibres musculaires co-exprimant le transactivateur et l'EPO murine. L'ensemble des réponses immunitaires mises en place provoqueraient la perte d'inductibilité du système de régulation Tet-on.

## Discussion et perspectives

---

L'objectif que nous nous étions fixé au cours de cette thèse était d'évaluer l'efficacité de nouveaux vecteurs synthétiques, les copolymères à blocs, développés récemment au laboratoire pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique. Ces vecteurs constituent un nouveau concept simple et non toxique pour véhiculer des plasmides de taille variable dans le muscle squelettique sain ou pathologique de modèles murins pertinents et représentatifs de pathologies humaines génétiques (dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)) ou acquises (anémie résultant de l'insuffisance rénale chronique).

### *Transfert de gène dans le muscle squelettique de souris myopathes mdx.*

Nous avons montré que l'injection intramusculaire d'un plasmide codant la mini-dystrophine murine formulé avec des copolymères à blocs a permis non seulement l'expression de la dystrophine mais aussi l'expression des protéines du complexe DGC à la membrane des fibres dystrophiques chez la souris *mdx*.

### *Efficacité de transfection dans le muscle dystrophique chez la souris mdx.*

Au cours de ces travaux, nous avons montré que les conditions utilisées pour transfecter le muscle pathologique de souris dystrophiques doivent être optimisées par rapport à des conditions normales. Les concentrations de copolymères à blocs habituellement efficaces pour augmenter l'expression de gènes rapporteurs dans le muscle sain ont été inefficaces dans le muscle dystrophique. Il était nécessaire de diminuer les concentrations de copolymères à blocs à injecter d'un facteur 5 à 10 par rapport aux concentrations efficaces dans le muscle sain pour améliorer de façon significative mais modérée le transfert de gènes dans le muscle pathologique comparé à l'ADN nu.

Les phénomènes de dégénérescence et de régénérescence existants chez la souris *mdx* semblent jouer un rôle important. En étudiant le transfert de gènes rapporteurs dans le muscle sain en régénérescence, nous avons essayé de comprendre en quoi cette caractéristique du muscle dystrophique pouvait influencer les conditions de transfection. Cependant, les mécanismes impliqués sont sans doute plus complexes dans le muscle dystrophique où les cycles de dégénérescence et de régénérescence surviennent de manière aléatoire et non simultanément dans l'ensemble du tissu musculaire. Cette étude nous a quand même permis de supposer que l'efficacité du transfert de gènes semble être influencée par l'état de maturation des fibres musculaires. Nous avons montré que contrairement à l'ADN nu, le transfert de gènes rapporteurs en présence de copolymères à blocs était inhibé dans le muscle sain traité à la cardiotoxine, essentiellement constitué de fibres immatures. Le transfert de gènes à l'aide de nos formulations semble donc avant tout cibler les cellules musculaires matures. De même, Wong et al. ont montré que l'efficacité du transfert de gène médié par l'électroporation est diminuée lorsque le muscle subit un pré-traitement avec la bupivacaine (Wong et al., 2005). Ces

résultats tendent également à montrer que les cellules transfectées après électrotransfert correspondent uniquement aux fibres musculaires matures. Or, les muscles de souris *mdx* âgées de 6 à 10 semaines sont constituées d'une majorité de jeunes fibres, de myoblastes et de cellules satellites activées pour compenser les phénomènes de nécrose. Ceci pourrait en partie expliquer la différence d'efficacité de transfection entre le muscle sain mature et le muscle dystrophique. Notons qu'il serait intéressant pour compléter cette étude d'étudier le transfert de gènes dans le muscle sain en régénérescence en présence de copolymères à blocs aux concentrations déterminées comme étant optimales chez la souris *mdx*.

Nos résultats montrent en revanche que l'efficacité de transfection de l'ADN nu et la biodistribution de l'expression du transgène sont légèrement supérieurs dans les muscles dystrophiques et sains en régénérescence par rapport au muscle sain mature. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui montrent également une meilleure expression de gènes rapporteurs après injection d'ADN nu dans le muscle en régénérescence (sain ou pathologique) par rapport au muscle mature (Davis *et al.*, 1993b, Wells *et al.*, 1998). La bio-distribution de l'ADN nu serait meilleure dans un tissu musculaire composé de jeunes myotubes de petit diamètre avec un tissu conjonctif peu abondant. De plus, la perméabilité membranaire pourrait être augmentée facilitant ainsi la diffusion des macromolécules d'ADN dans le muscle. Il a été démontré que l'internalisation de l'ADN pouvait être médiée par des récepteurs présents sur la fibre musculaire (Budker *et al.*, 2000, Satkauskas *et al.*, 2001). Enfin, le nombre de récepteurs pourrait varier selon l'état de maturation du tissu musculaire ce qui influencerait l'efficacité de transfection.

La présence d'une matrice extracellulaire intacte semble être requise pour une obtenir une bonne efficacité de transfection *in vivo* à l'aide de copolymères à blocs. Outre la nature des fibres constituant le muscle dystrophique, l'efficacité moindre des copolymères à blocs (pour des concentrations habituellement utilisées chez la souris saine) à délivrer un plasmide dans le muscle dystrophique pourrait être due à l'altération de l'architecture de la matrice extracellulaire. C'est d'ailleurs peut-être pour cette raison que les copolymères à blocs sont totalement dépourvus d'efficacité pour la transfection de cellules musculaires (C2C12) en culture. On ne peut cependant pas exclure un effet délétère des copolymères utilisés à forte dose dans un tissu musculaire fragilisé par l'absence de dystrophine et de ses protéines associées.

#### *Expression de la dystrophine et des protéines du DGC après transfert de gène non viral chez la souris mdx.*

Nous avons montré que pour les plasmides de petite taille codant la GFP ou la luciférase (4.7 kb à 6.3 kb), l'efficacité des copolymères à blocs (aux doses optimisées) par rapport à l'ADN nu était moindre chez la souris *mdx* comparativement à la souris saine (augmentation du transfert de gènes d'un facteur 2). En revanche, pour des plasmides de plus grande taille, comme le plasmide codant la mini-dystrophine (16.1 kb), l'efficacité de transfection des copolymères à bloc chez la souris *mdx* est 30 fois supérieure à l'injection intramusculaire d'ADN nu. Et contrairement à l'injection d'ADN nu, une



expression suffisante de la mini-dystrophine faisant suite à l'injection intramusculaire du mélange copolymères à blocs/ADN a permis la restauration des protéines du complexe membranaire associé à la dystrophine chez la souris *mdx*. Nous pouvons donc envisager une atténuation du défaut de la fonction contractile chez ces souris *mdx*.

Il a été décrit dans la littérature qu'il faut au minimum 20% de fibres exprimant la dystrophine ou la mini-dystrophine pour améliorer la résistance du muscle lors d'efforts concentriques et téaniques (Wells *et al.*, 1995). Cependant, nos travaux montrent que le taux de fibres exprimant la dystrophine n'excède pas 10% après une seule injection de la formulation copolymère à blocs/ADN. Dans le but d'améliorer l'efficacité de transfection, nous avons réalisé des expériences complémentaires consistant à injecter dans le tibial antérieur de souris *mdx* des formulations contenant une quantité plus importante d'ADN (jusqu'à 170 µg de plasmide codant la mini-dystrophine par muscle), mais le niveau de transfection n'est pas amélioré par rapport à la dose maximale utilisée dans l'étude présentée (50 µg/muscle). Il serait donc intéressant de pratiquer de multiples injections intramusculaires afin d'augmenter le nombre de fibres exprimant la mini-dystrophine, ce qui est ailleurs facilement envisageable avec les copolymères à blocs non toxiques. Toujours dans le but d'améliorer cette efficacité de transfection, une autre technique pourrait être envisagée, celle-ci consisterait en l'administration de la formulation par voie intravasculaire loco-régionale (par la veine saphène par exemple). Cette technique a été réalisée avec succès chez la souris *mdx* pour l'administration d'ADN nu (Liang *et al.*, 2004a, Zhang *et al.*, 2004a). Compte tenu de l'augmentation de l'efficacité de transfection obtenue avec les copolymères à blocs en injection IM directe par rapport à l'ADN nu, nous envisageons d'évaluer le potentiel de ces vecteurs pour exprimer efficacement la dystrophine dans l'ensemble des fibres dystrophiques en administrant les formulations par voie vasculaire. Les copolymères à blocs comme le poloxamine 304 représentent des vecteurs particulièrement intéressants pour délivrer l'ADN dans le muscle squelettique par voie vasculaire. En effet, ces vecteurs contiennent, en plus des chaînes d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène, un groupement central éthylène diamine possédant une charge positive capable d'interagir avec les groupements phosphates de l'ADN chargés négativement. Ces interactions électrostatiques permettraient ainsi la formation d'objets stables (Pitard *et al.*, 2004). De plus la charge globale négative de ces objets fait d'eux des objets inertes vis à vis des protéines sériques.

D'autre part, des études menées dans un contexte de thérapie génique corrective, consistant à réparer le gène endogène de la dystrophine par la technique du saut d'exon, ont montré l'intérêt d'utiliser le poloxamère 407 pour véhiculer des oligonucléotides anti-sens et ainsi permettre l'expression de la dystrophine dans les muscles squelettiques et cardiaques chez la souris *mdx* (Lu *et al.*, 2003b, Lu *et al.*, 2005). La technologie du saut d'exon fait appel à des chimies différentes conduisant à l'élaboration de divers types d'oligonucléotides anti-sens. Les oligonucléotides antisens (ODN) sont de courts oligonucléotides synthétiques (entre 13 et 25 nucléotides en général) d'ADN complémentaire de sites spécifiques sur la séquence de l'ARNm cible, formant ainsi un hybride ARN/ADN capable d'inhiber

l'épissage de l'ARNm ciblé. Depuis les années 1990, le squelette des ODN a été modifié chimiquement pour augmenter leur solubilité, leur stabilité, leur efficacité, et leur pénétration dans les cellules. Les études de Lu et al. citées précédemment, relatent l'intérêt d'utiliser le poloxamère P407 pour véhiculer, par voie IM ou IV, les oligonucléotides de seconde génération (les 2'O-méthyle phosphorothioates -2OmeAO) et ainsi induire efficacement le saut de l'exon 23 du gène de la dystrophine chez la souris *mdx*. En revanche, aucun effet bénéfique de ce poloxamère n'a été observé sur l'expression de la dystrophine dans le muscle de souris *mdx* après injection IM d'oligonucléotides de troisième génération, les morpholinos (*Fletcher et al., 2006*). Ces différences d'efficacité sembleraient être liées à la nature chimique des oligonucléotides, en effet, les 2OmeAO sont des oligonucléotides chargés négativement alors que les morpholinos sont des oligonucléotides neutres. Ces résultats suggèrent l'importance de la charge des acides nucléiques à véhiculer avec les poloxamères pour assurer une bonne efficacité de transfection. Et même si la plupart des études ont montré une expression de la dystrophine jusqu'à 5 semaines après injection d'oligonucléotides seuls ou formulés, la durée de vie des oligonucléotides *in vivo* nécessite de réaliser autant d'injections que nécessaire (*Alter et al., 2006*). Une expression diffuse et sur le long terme de la protéine pourrait être envisagée en délivrant par voie vasculaire un plasmide codant des séquences anti-sens (capables d'induire le saut de l'exon 23 du gène de la dystrophine) en présence de copolymères à blocs.

Au cours de cette première étude, nous avons donc montré que les copolymères à blocs constituaient une nouvelle classe de vecteurs synthétiques efficace pour délivrer des plasmides de grande taille, non seulement dans le muscle squelettique sain, mais aussi dans le muscle pathologique comme le muscle dystrophique. Mais le potentiel des copolymères à blocs ne s'arrête pas là, de nombreuses perspectives sont aujourd'hui ouvertes. Si le muscle squelettique est l'organe cible du transfert de gène codant la dystrophine pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne, il est également en théorie un organe de choix pour la production en systémique de protéines d'intérêt thérapeutique. C'est pourquoi la seconde étude présentée consistait à évaluer le potentiel du transfert du gène codant l'érythropoïétine (EPO) dans le muscle squelettique à l'aide de copolymères à blocs pour la sécrétion ectopique de la protéine d'intérêt en vue du traitement de l'**anémie associée à l'insuffisance rénale chronique**.

#### ***Traitement de l'anémie au cours de l'insuffisance rénale chronique chez la souris.***

Parce qu'aucun modèle murin n'avait été décrit auparavant dans la littérature, la première étape de notre étude fut de mettre au point un modèle murin d'insuffisance rénale chronique en collaboration avec le Pr. BEUZARD et le Dr. PAYEN (Laboratoire de Thérapie Génique Hématopoïétique, hôpital Saint Louis, INSERM U733, Paris). L'administration de l'adénine à une dose de 0.25% dans la ration alimentaire des souris induit la destruction progressive des reins au bout de 45 jours de traitement. Les reins de souris traitées sont alors dans l'incapacité de produire et de sécréter l'EPO, ce qui conduit à

l'apparition d'une anémie acquise, évaluée par la mesure du taux d'hématocrite. Dans ce modèle de souris anémiques, nous avons étudié l'effet du transfert de gène de l'EPO murine dans le muscle squelettique à l'aide d'un copolymère à blocs, le Lutrol. Les résultats indiquent que des injections du plasmide pCMV-mEPO (codant de façon constitutive l'EPOm) formulé dans le muscle squelettique permettent la correction du phénotype anémique ou prévient l'apparition de l'anémie acquise chez les souris malades, mais ne permet pas de corriger la fonction rénale altérée par l'administration de l'adénine.

Des études plus pointues réalisées chez le gros animal, chat ou macaque par exemple, nous permettraient d'étudier l'intérêt de ce nouveau type de traitement thérapeutique, simple, sûr et peu coûteux avant d'envisager une application clinique.

*Mise en évidence d'une anémie auto-immune après transfert du gène codant l'EPO murine chez la souris Swiss immunocompétente.*

L'utilisation de ces vecteurs synthétiques et non immunogènes pour le transfert de gène codant l'EPOm, a permis d'observer d'un effet biologique stable de la protéine sur le long terme après de multiples injections de faibles quantités de plasmide pCMV-mEPO (2.5µg/muscle) dans le muscle squelettique de souris Swiss non co-sanguines, saines et immunocompétentes. Une seule injection de 10µg par muscle de ce même plasmide formulé avec les copolymères à blocs chez la souris Swiss a permis une élévation significative de l'hématocrite par rapport à l'injection d'ADN nu pendant 14 jours, mais au delà de ces 14 jours, le taux d'hématocrite a drastiquement chuté pour atteindre une valeur inférieure à la valeur basale 50 jours après l'injection. Cette anémie serait secondaire à la mise en place d'une réponse immune humorale, avec apparition d'anticorps neutralisants dirigés contre l'EPOm issue du transfert de gène mais aussi contre l'EPO endogène de la souris injectée. La durée de vie limitée des souris anémiques de notre modèle d'insuffisance rénale (40 jours environ après le début du traitement) ne nous a pas permis d'étudier l'effet d'une injection IM de 10 µg de plasmide pCMV-mEPO formulé sur le long terme et donc de mettre en évidence une anémie auto-immune.

Plusieurs études ont récemment décrit l'apparition d'une anémie auto-immune chez le macaque après transfert du gène codant l'EPO dans le muscle squelettique à l'aide de vecteurs viraux AAV (*Chenuaud et al., 2004b, Gao et al., 2004b*). En revanche, l'apparition d'une anémie auto-immune n'a jamais été observée chez la souris immunocompétente après transfert du gène codant l'EPO murine à l'aide de techniques non virales de transfert de gènes comme l'électrotransfert (*Rizzuto et al., 1999, Kreiss et al., 1999, Payen et al., 2001b*). Cependant ces études ont été réalisées chez des souris co-sanguines de souche C57bl/6. L'injection intramusculaire du gène codant l'EPOm (10µg/muscle) en présence de Lutrol 3% réalisée dans les mêmes conditions n'a pas provoquée d'anémie auto-immune chez la souris C57bl/6 contrairement aux souris Swiss, et ceci malgré le fait que le taux d'hématocrite maximal atteint soit équivalent. Ces différents effets ne sont pas clairement compris mais la souris

Swiss pourrait présenter un niveau de variabilité génétique plus hétérogène et donc un répertoire immunitaire plus riche que la souris co-sanguine de souche C57bl/6.

*Mécanismes possiblement impliqués dans l'apparition de l'anémie auto-immune après transfert de gène dans le muscle squelettique de souris Swiss.*

L'apparition d'anticorps neutralisants dirigés contre l'EPO recombinante et endogène après transfert de gène n'est pas clairement élucidée, néanmoins une piste intéressante semble de plus en plus étudiée : L'EPO sécrétée par le muscle squelettique de macaque après transfert de gène à l'aide de vecteurs AAV présente un profil isoélectrique différent de l'EPO sérique endogène (*Lasne et al., 2004*). Des différences de glycosylation, de sulfatations, de clivage du peptide signal ou encore de délétion du résidu basique C-terminal Arginine pourraient être à l'origine de la production d'une protéine anormale et/ou différemment synthétisée après transfert de gène dans le muscle squelettique.

Le séquençage du gène endogène codant l'EPO réalisé chez les macaques anémiques injectés avec ces vecteurs AAV a permis de conclure que la séquence du gène endogène était identique à la séquence codante contenue dans les vecteurs AAV (*Chenuaud et al., 2004b, Gao et al., 2004b*). Ces résultats sous-entendent que les anticorps dirigés contre l'EPO sont des anticorps reconnaissant des épitopes conformationnels. En effet, l'étude de Chenuaud et al., suggère que la production d'une protéine EPO hypoglycosylée par le muscle squelettique permettrait la reconnaissance d'épitopes conformationnels sur la protéine EPO entraînant ainsi une rupture de tolérance chez le macaque (*Chenuaud et al., 2004b*). Cette rupture de tolérance semble cependant être transitoire chez certains macaques. Bien que des analyses supplémentaires soient nécessaires pour l'affirmer, cela ne semblerait pas être le cas chez la souris Swiss après transfert de gène non viral car le taux d'hématocrite est maintenu en dessous de sa valeur basale pendant au moins 80 jours. Mais pareillement aux études de transfert de gène viral menées chez le macaque, les anticorps auto-immuns suspectés, chez la souris Swiss anémique après transfert du gène codant l'EPO en présence de Lutrol, seraient également dirigés contre des épitopes conformationnels. Le séquençage du gène codant l'EPO endogène chez ces souris anémiques a indiqué que la séquence du gène endogène était identique à la séquence codante du plasmide pCMV-mEPO injecté.

Devant le peu d'études publiées à ce sujet, des investigations supplémentaires concernant notamment la caractérisation et les conditions conduisant à l'apparition de l'anémie auto-immune après transfert de gène dans le muscle squelettique sont nécessaires. L'utilisation de petits animaux comme la souris Swiss, injectée en IM avec 10 µg de plasmide pCMV-mEPO formulé avec des copolymères à blocs, pourrait ainsi représenter un modèle d'étude unique, simple et peu coûteux.

De façon intéressante, nous avons également montré que l'anémie auto-immune pouvait être évitée chez la souris Swiss immunocompétente après transfert du gène codant l'EPOm grâce à l'utilisation de copolymères à blocs dans un schéma d'injections répétées. En effet, quatre injections répétées et successives de faibles quantités d'ADN (2.5 µg/muscle) formulé avec le Lutrol 3% ont permis d'obtenir un effet stable de l'EPOm sur le taux d'hématocrite pendant au moins 300 jours chez la souris Swiss. Des expériences complémentaires non détaillées, nous ont permis de vérifier que les 4 injections intramusculaires réalisées à une semaine d'intervalle sont indépendantes les unes des autres.

*Pourquoi ce protocole d'injection utilisant une même quantité totale d'ADN injectée et de protéines sécrétées par le muscle permet-il d'échapper à la mise en place d'une anémie auto-immune?*

*Importance de la quantité de protéines synthétisées.*

Dans l'étude de Chenuaud et al., l'apparition de l'anémie auto-immune chez le macaque n'a pas été systématiquement reliée aux quantités de vecteurs administrés et/ou de protéines synthétisées (Chenuaud et al., 2004b). Nos travaux indiquent que l'injection de quantités croissantes d'ADN formulé avec le Lutrol dans le muscle squelettique de souris Swiss conduit à la production d'EPOm sérique de façon dose dépendante. Or c'est seulement après l'injection IM de 10µg de plasmide formulé que l'anémie auto-immune apparaît. Un tel effet secondaire n'a jamais été observé chez les souris injectées avec 2.5 ou 5 µg de plasmide formulé.

L'injection unique de 10 µg d'ADN formulé pourrait induire un défaut de glycosylation de la protéine dû à une trop forte expression du transgène et une saturation de la machinerie cellulaire. Ce défaut de glycosylation pourrait être dépendant de la quantité de protéines synthétisées et par conséquent de la quantité d'ADN injectée. Le niveau d'expression atteint après une injection de 2.5 µg de plasmide formulé pourrait aboutir à la production d'une protéine glycosylée correctement (ou du moins de façon moins aberrante) et donc non immunogène. Des expériences supplémentaires d'analyse du profil isoélectrique de l'EPOm après transfert de gène sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse et sont en cours de réalisation en collaboration avec le Dr. Françoise LASNE (Laboratoire National du Dopage, Paris). Nous ne pouvons cependant pas exclure que ces anticorps aient pour origine une protéine EPO rendue immunogène car dénaturée ou agrégée après l'injection de quantités importantes de plasmide.

*Importance de la quantité de protéines synthétisées et de l'inflammation.*

La quantité d'EPO sécrétée ne semble cependant pas être le seul facteur impliqué dans l'apparition de l'anémie : l'injection intramusculaire de 10 µg de plasmide formulé avec le Lutrol a induit une anémie auto-immune et 4 injections répétées de 2.5 µg de plasmide formulé n'ont induit aucun effet secondaire similaire, pour autant les concentrations sériques en EPO ne sont pas significativement différentes entre ces deux groupes de souris (67,2 +/-20,8 mU/ml pour le groupe de souris injectées

avec 4 fois 2.5 µg de plasmide formulé et 116.8 +/- 44.3 mU/ml pour le groupe de souris injecté avec 10µg de plasmide formulé).

L'inflammation engendrée par l'ADN injecté serait également un facteur limitant pour l'obtention d'un effet biologique de la protéine EPO sur le long terme. Les dinucléotides CpG non méthylés présents sur les séquences plasmidiques de l'ADN représentent des motifs déterminants pour l'activation des réponses immunes innée et adaptative après transfert de gènes (*Krieg. 2003*). Des injections de faibles doses d'ADN permettraient de réduire l'inflammation locale et ainsi d'échapper à la mise en place d'une réaction immunitaire. En effet, nous avons montré que l'injection de 10µg de plasmide formulé avec le Lutrol induit une réponse inflammatoire importante au sein du muscle, et contrairement à cela, l'injection de 2.5 µg de plasmide formulé n'induit aucune réponse inflammatoire. Pour autant l'inflammation engendrée par les motifs CpG non méthylés ne semble pas être le seul facteur impliqué dans l'apparition de l'anémie auto-immune. En effet, aucune anémie auto-immune n'a été décelée chez les souris injectées avec 10µg de plasmide nu. De plus, lors des 4 injections successives de 2.5µg de plasmide formulé dans le tibia antérieur de la souris Swiss, la quantité totale de motifs CpG non méthylés équivaut à 10µg.

Afin d'expliquer l'apparition de l'anémie auto-immune uniquement chez les souris injectées une seule fois avec 10µg de plasmide formulé, nous émettons l'hypothèse suivante :

L'injection unique de 2.5 µg de plasmide formulé permettrait la production de la protéine EPOm en quantité limitée, normalement maturée et probablement non immunogène ainsi capable d'avoir une activité biologique sur le long terme chez la souris immunocompétente. La répétition de 4 injections consécutives (à une semaine d'intervalle) avec cette faible quantité d'ADN en présence de Lutrol permettrait donc d'atteindre progressivement et durablement un niveau d'EPO sérique et un effet biologique satisfaisants. Au contraire, une seule injection de 10 µg du même plasmide formulé dans le muscle de souris Swiss immunocompétente provoque d'une part une réponse inflammatoire importante et d'autre part une production rapide et importante d'EPO, la rendant immunogène (par un défaut de glycosylation, de dénaturation ou autre).

Ce serait donc l'association des deux paramètres que sont l'inflammation et la quantité de protéines produites qui serait à l'origine de l'anémie auto-immune. De façon à discriminer le phénomène prédominant, il serait intéressant de suivre l'effet du transfert de gène codant l'EPOm après injection de 2.5 µg de plasmide formulé avec le Lutrol en absence ou en présence de 7.5 µg de plasmide non codant formulé (équivalent 2.5 ou 10 µg de motifs CpG non méthylés). Pour confirmer l'importance des motifs CpG non méthylés dans l'apparition de l'anémie auto-immune, il serait également intéressant d'étudier l'effet d'une seule injection IM de 10 µg de plasmide déplété en motifs CpG formulé chez des souris Swiss immunocompétentes.

*Le Lutrol possède-t-il des propriétés immunoadjuvantes ?*

Il a été démontré que certains copolymères à blocs dont le Lutrol, présentaient des propriétés adjuvantes : administrés par voie intraveineuse, en présence d'antigènes ils permettraient d'amplifier les réponses immunes humorales et cellulaires contre les antigènes (Voir partie 3.2b de l'Introduction). Dans notre étude le Lutrol pourrait également posséder de propriétés adjuvantes vis à vis de la protéine EPO synthétisée *de novo* par le muscle squelettique après transfert de gène. En effet, après injection IM, le Lutrol résiduel dans les fibres musculaires ou dans la matrice extra-cellulaire pourrait prendre en charge la protéine EPO produite par le muscle et induire l'activation d'une réponse immunitaire spécifique. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous réalisons actuellement des injections IM et sous-cutanée de la protéine recombinante rHuEPO (Néorecormon<sup>TM</sup>) en absence ou en présence de Lutrol à 3% et suivons l'évolution du taux d'hématocrite des souris Swiss en fonction du temps.

Une autre façon de déterminer le rôle du Lutrol 3% dans l'apparition de l'anémie auto-immune serait d'étudier l'effet d'injections IM de quantités plus fortes de plasmide pCMV-mEPO nu (supérieure à 10µg/muscle), permettant d'obtenir un taux d'hématocrite équivalent à l'injection de 10µg de plasmide formulé avec le Lutrol 3%, sur l'apparition d'une anémie auto-immune.

D'ores et déjà certains résultats nous permettent d'écarter le rôle immuno-adjuvant du Lutrol à 3% après transfert de gènes :

- i. Les analyses histopathologiques tissulaires des muscles injectés avec le Lutrol seul, réalisées une semaine après injection, n'ont pas mis en évidence d'infiltrat cellulaire ou de nécrose des fibres musculaires,
- ii. Le niveau d'IL-6 musculaire dosé à différents temps après l'injection du Lutrol seul n'est pas significativement différent par rapport au taux d'IL-6 d'un muscle injecté avec le Tyrode et reste significativement inférieur aux taux d'IL-6 mesurés après injections de 2.5 ou 10 µg de plasmide formulé,
- iii. Aucune anémie auto-immune n'a pu être mise en évidence chez les souris injectées avec des quantités d'ADN allant de 1 à 5 µg de plasmide formulé avec le Lutrol, alors que l'injection de 10µg de plasmide formulé avec la même quantité de Lutrol induit l'apparition d'une anémie.

*Le muscle squelettique demeure-t-il l'organe idéal pour la sécrétion ectopique d'EPO après transfert de gène ?*

Dans le contexte de transfert de gènes non viral, plusieurs études ont montré les limites du muscle squelettique comme organe sécréteur pour des protéines d'intérêt thérapeutique comme l'insuline, ou l'hormone de croissance (Croze et Prud'homme., 2003, Draghia-Akli et al., 2006). Le muscle squelettique adulte de rongeur ne posséderait pas toutes les enzymes nécessaires aux processus de maturation de ces protéines (Kon et al., 1999, Shaw et al., 2002, Croze et Prud'homme, 2003). De même, la sécrétion du facteur IX par le muscle squelettique est sujette à controverse. Une étude a montré que le facteur IX humain sécrété, après transfection de myotubes humains à l'aide d'un vecteur AAV, n'était pas correctement glycosylé (Arruda et al., 2001). Ce défaut de glycosylation pourrait en partie expliquer la mise en place d'anticorps anti-FIX après transfert de gène dans le muscle squelettique chez la souris. Toutefois ce cas de figure est différent du nôtre, le FIX n'est pas présent avant transfert de gène car ces études sont réalisées dans des modèles animaux hémophiles déficients pour le gène d'intérêt (Herzog et al., 2002, Arruda et al., 2004). Le développement d'une anémie auto-immune après transfert de gène codant l'EPO pourrait également remettre en cause l'utilisation du muscle squelettique comme organe sécréteur d'érythropoïétine. En théorie, le muscle squelettique représente un organe de choix pour la sécrétion ectopique et fonctionnelle d'EPO sur le long terme, mais les résultats obtenus après transfert de gène à l'aide de vecteurs AAV montrent que ce n'est pas nécessairement le cas. En l'absence de protocole efficace pour permettre la sécrétion sur le long terme d'une EPO fonctionnelle par le muscle squelettique, certains groupes ciblent aujourd'hui le foie pour le transfert du gène codant l'EPO à l'aide des vecteurs AAV (Gao et al., 2006). Ces auteurs ont montré que contrairement à l'injection intramusculaire, l'injection du gène codant l'EPO à l'aide de vecteurs AAV dans le foie de macaque permet une expression stable de la protéine avec une élévation du taux d'hématocrite en conséquence. Le foie est effectivement le siège d'une synthèse d'EPO extra-rénale chez l'homme et est l'organe de production de l'EPO fœtale.

De façon intéressante, l'EPO produite après transfert de gène dans la rétine de primate à l'aide de vecteurs AAV présente le même profil isoélectrique que l'EPO endogène, notons que l'EPO et son récepteur sont exprimés physiologiquement dans la rétine d'animaux adultes (Lasne et Rolling, non publié).

Ces résultats indiquent que le ciblage du transfert de gène codant l'EPO à l'aide de vecteurs AAV dans des organes exprimant physiologiquement le gène codant l'EPO serait plus opportun pour obtenir une production ectopique normale et un effet biologique efficace de la protéine sur le long terme. Si l'utilisation du muscle squelettique comme organe sécréteur d'EPO semble ainsi remise en cause pour le transfert de gène à l'aide d'AAV, nous avons néanmoins montré que ceci n'était pas vrai pour le transfert de gène non viral utilisant des vecteurs synthétiques non immunogènes tels que les copolymères à blocs. Nos résultats montrent en effet que le muscle squelettique est effectivement un



organe idéal pour la sécrétion d'EPO fonctionnelle sur le long terme après transfert de gène à l'aide de copolymères à blocs. Ces vecteurs synthétiques représentent un énorme avantage par rapport à l'utilisation de vecteurs viraux trop immunogènes pour envisager des administrations répétées (*Walker et al., 2005*).

Le transfert du gène codant l'EPOm dans le foie à l'aide de copolymères à blocs galactosylés reste cependant une technique intéressante afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'apparition de l'anémie auto-immune.

### ***Régulation de l'expression du gène codant l'EPO après transfert de gène dans le muscle squelettique.***

L'obtention d'un effet biologique stable de l'EPO après transfert de gène non viral dans le muscle squelettique est une première étape pour le développement clinique d'un tel traitement ; dans le contexte précis du transfert de gène codant l'EPO, il serait souhaitable de disposer d'un système de régulation temporelle de l'expression du gène. Le risque déjà élevé d'hypertension artérielle et de thrombose chez les patients en insuffisance rénale ne doit pas être amplifié par l'administration de la protéine thérapeutique. L'obtention chez l'animal d'un niveau d'expression **stable et régulable du transgène sur le long terme** constituerait donc un progrès essentiel vers les essais cliniques.

Parmi tous les systèmes de régulation génique développés jusqu'alors pour le transfert de gène, le système de régulation basé sur l'utilisation de la rapamycine, semble le plus adéquat pour contrôler sur le long terme l'expression du transgène EPO chez le primate (*Rivera et al., 2005*). La limitation de ce système est liée aux propriétés immunosuppressives de la rapamycine. L'utilisation de dérivés non-immunosuppresseurs s'impose pour une application thérapeutique, l'activité immunosuppressive de ces dérivés reste à étudier chez le macaque.

Un autre système de régulation génique couramment utilisé pour le transfert de gène est le système Tet-on, ce système très actuellement le système le plus efficace. De plus, la pharmacologie de la tétracycline (ou de son analogue, la doxycycline) est bien connue. Des modifications récentes ont été apportées à ce système incluant un nouveau transactivateur rtTA2s-M2 qui permet un contrôle plus strict de l'expression d'un gène par la doxycycline (*Urlinger et al., 2000*). Nos travaux ont montré que l'utilisation de ce système de régulation amélioré a permis la régulation au moyen terme du gène codant l'EPO murine après transfert de gène à l'aide de copolymères à blocs dans le muscle squelettique de souris Swiss immunocompétentes.

La mesure du taux d'hématocrite des souris injectées avec 10 µg du plasmide pTet-o-mEPO formulé avec le copolymère à blocs PE6400, n'ont pas laissé présumer d'anémie auto-immune chez les souris Swiss immunocompétentes. Malgré tout, nous ne pouvons pas exclure que des anticorps neutralisants dirigés contre l'EPOm soient également impliqués dans la chute du taux d'hématocrite, comme précédemment décrit après injection intramusculaire de la même quantité du plasmide pCMV-mEPO

(codant de façon constitutive l'EPOm) formulé avec la même concentration de PE6400. Des analyses supplémentaires seraient donc nécessaires pour compléter ces résultats.

*Mise en évidence d'une réponse immune humorale contre le transactivateur.*

L'injection de faibles quantités du plasmide pTet-o-mEPO, codant l'EPOm de manière inductible par la doxycycline, formulé avec un copolymère à blocs a permis d'obtenir une régulation de l'expression du transgène pendant 4 mois chez la souris immunocompétente. Au delà de ces 4 mois, le taux d'hématocrite des souris a chuté rendant impossible toute régulation. Nous avons démontré que ce manque d'efficacité de régulation sur le long terme était lié à la mise en place d'une réponse immunitaire de type humorale dirigée contre le transactivateur chimérique rtTA2s-M2. L'apparition tardive de la réponse immune semblerait être en faveur d'une cross-présentation des antigènes issus de la protéine rtTA2s-M2 aux lymphocytes T. Le traumatisme induit par l'injection pourrait également provoqué une nécrose ou une lyse cellulaire des fibres transfectées et une fuite des protéines rtTA2s-M2 dans le milieu extracellulaire. Ces protéines chimériques seraient alors présentées aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) capables de déclencher toute la cascade de l'immunité humorale et cellulaire. Nous n'excluons cependant pas une transfection directe des CPA elles-mêmes, dans ce cas l'utilisation d'un promoteur muscle spécifique représente une excellente alternative.

Ce système Tet-on et d'autres systèmes apparentés ont déjà été décrits comme étant immunogènes chez le macaque après transfert de gènes (*Latta-Mahieu et al., 2002, Favre et al., 2002, Chenuaud et al., 2004a, Ginhoux et al., 2004*). Par contre, il n'avait jamais été observé de réponse immunitaire dirigée contre le transactivateur rtTA chez la souris après injection IM d'ADN nu (*Rizzuto et al., 1999*). Cependant dans cette étude, l'injection d'un mélange de plasmides, l'un codant le transactivateur rtTA et l'autre codant de façon inductible l'EPOm, permet une régulation de l'EPO à un niveau faible : le taux d'hématocrite oscille entre 45 à 55% environ en fonction de l'administration de la doxycycline et ce pendant un temps maximum de 70 jours. Par contre, dans l'étude de Larmartina et al., la technique d'électrotransfert chez la souris co-sanguine de fond génétique Balb/c et du système rtTA de dernière génération (tTs-kid) a permis une régulation du transgène codant l'EPOm sur le long terme (*Larmartina et al., 2003*). Pourtant une étude récente a montré que certains épitopes de la protéine rtTA de première génération pouvaient être reconnus (présentation par les molécules du CMH de classe I) chez la souris HHD humanisée après électrotransfert dans le muscle squelettique (*Ginhoux et al., 2004*). Ce modèle reste cependant un modèle imparfait car aucune réponse immune n'a été observée après transfert de gènes à l'aide de vecteurs viraux AAV chez la souris ou le macaque contrairement aux travaux de Favre et Chenuaud (*Favre et al., 2002, Chenuaud et al., 2004a*).

Pour la première fois dans un contexte de transfert de gènes non viral, nous avons montré les limites du système de régulation Tet-on utilisant la protéine chimérique rtTA2s-M2 susceptible de provoquer une réponse immunitaire chez le petit animal immunocompétent et non co-sanguin et donc à plus forte raison chez l'homme. Les effets indésirables d'un tel système de régulation composé de protéines

chimériques bactériennes et virales nous conduisent aujourd'hui à étudier un nouveau système de régulation. Parce que l'hypoxie est caractéristique de plusieurs maladies dont l'anémie, l'utilisation d'un système de régulation basé sur l'hypoxie paraît particulièrement adapté au traitement de l'anémie en cas d'insuffisance rénale chronique. En effet, une approche simple de régulation consiste à adjoindre au gène codant l'EPOm un promoteur, inductible par l'environnement physiologique, ayant la séquence HRE (hypoxia responsive element). Dans ce cas l'ajustement de l'expression du transgène est auto-régulée par le niveau d'hypoxie et non plus dépendant des doses de l'agent inducteur administré *per os* en fonction de la surveillance du taux d'hématocrite. Ce système de régulation endogène hypoxie-dépendant constituerait une poursuite logique de ce travail et est en cours d'étude pour le transfert de gène codant l'EPOm à l'aide de copolymères à blocs dans le muscle squelettique de souris en insuffisance rénale chronique.

## Conclusion générale

Au cours de ma thèse, j'ai montré que le transfert de gènes dans le muscle squelettique à l'aide des copolymères à blocs représentait une stratégie d'avenir pour le traitement de maladies génétiques héréditaires ou acquises.

Le transfert du gène codant la mini-dystrophine murine à l'aide de copolymères à blocs a permis l'expression efficace de la dystrophine pour la restauration du complexe dystroglycoprotéique (DGC) membranaire chez la souris myopathe *mdx*.

L'utilisation de l'érythropoïétine humaine recombinante (rHuEPO) a révolutionné le traitement de l'anémie associée à l'insuffisance rénale chronique (IRC). La protéothérapie est une thérapie contraignante et coûteuse. De plus, depuis environ une dizaine d'années le nombre de patients insuffisants rénaux présentant une anémie auto-immune, consécutive à l'administration de certaines protéines EPO recombinantes, est en recrudescence (*Locatelli et al., 2004*). Le transfert de gènes dans le muscle squelettique représente en théorie une alternative prometteuse consistant à utiliser les propres cellules du patient en tant que bio-réacteurs naturels. Cependant, les premières études pré-cliniques réalisées dans le domaine du transfert du gène codant l'EPO à l'aide de vecteurs viraux AAV ont montré que la protéine sécrétée par le muscle squelettique n'était que transitoirement fonctionnelle, les animaux injectés n'échappent pas à l'apparition d'une anémie auto-immune (*Chenaid et al., 2004b, Gao et al., 2004b*). Au cours de la deuxième partie de ma thèse, j'ai montré que de multiples injections intramusculaires du gène codant l'EPOm formulé avec des copolymères à blocs, permettaient d'adapter durablement le niveau de sécrétion de la protéine à partir du muscle squelettique sans effets secondaires néfastes chez la souris Swiss non co-sanguine immunocompétente. Ce protocole de multi-injections à l'aide de copolymères à blocs a permis la correction du phénotype anémique chez des souris en insuffisance rénale chronique.

Si ce protocole permet d'obtenir une sécrétion ajustable et continue de l'EPOm après transfert de gène dans le muscle squelettique, il n'en reste pas moins que pour un développement clinique sûr il serait préférable de concevoir un système de régulation permettant également l'extinction de l'expression du transgène en cas d'effets secondaires graves. Dans la dernière partie de ma thèse, j'ai montré qu'un système de régulation Tet-on amélioré, utilisant un promoteur inductible par la doxycycline, permettait de réguler transitoirement l'expression du gène codant l'EPOm après transfert de gène dans le muscle squelettique en présence de copolymères à blocs chez la souris Swiss immunocompétente. Cependant, l'apparition d'une réaction immunitaire dirigée contre les protéines chimériques du système de régulation serait à l'origine de son inactivation 4 mois après l'injection. A la lumière de ces résultats, il serait intéressant de développer de nouveaux systèmes de régulation plus simples et non immunogènes pour le transfert de gènes non viral à l'aide de copolymères à blocs dans le muscle squelettique.

## Références bibliographiques

---

- 't Hoen PA, van der Wees CG, Aartsma-Rus A *et al.* Gene expression profiling to monitor therapeutic and adverse effects of antisense therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Pharmacogenomics*. 2006; **7**: 281-297.
- Abai AM, Hobart PM, Barnhart KM. Insulin delivery with plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* 1999; **10**: 2637-2649.
- Abruzzese RV, Godin D, Mehta V *et al.* Ligand-dependent regulation of vascular endothelial growth factor and erythropoietin expression by a plasmid-based autoinducible GeneSwitch system. *Mol. Ther.* 2000; **2**: 276-287.
- Acsadi G, Dickson G, Love DR *et al.* Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 1991; **352**: 815-818.
- Agha-Mohammadi S, Lotze MT. Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *J. Clin. Invest* 2000; **105**: 1177-1183.
- Alila H, Coleman M, Nitta H *et al.* Expression of biologically active human insulin-like growth factor-I following intramuscular injection of a formulated plasmid in rats. *Hum. Gene Ther.* 1997; **8**: 1785-1795.
- Allsop KG, Ziter FA. Loss of strength and functional decline in Duchenne's dystrophy. *Arch. Neurol.* 1981; **38**: 406-411.
- Alter J, Lou F, Rabinowitz A *et al.* Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat. Med.* 2006; **12**: 175-177.
- Anwer K, Shi M, French MF *et al.* Systemic effect of human growth hormone after intramuscular injection of a single dose of a muscle-specific gene medicine. *Hum. Gene Ther.* 1998; **9**: 659-670.
- Aoyama T, Hosseinkhani H, Yamamoto S, Ogawa O, Tabata Y. Enhanced expression of plasmid DNA-cationized gelatin complex by ultrasound in murine muscle. *J. Control Release* 2002; **80**: 345-356.
- Archer JD, Vargas CC, Anderson JE. Persistent and improved functional gain in mdx dystrophic mice after treatment with L-arginine and deflazacort. *FASEB J.* 2006; **20**: 738-740.

- Arruda VR, Hagstrom JN, Deitch J *et al.* Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX. *Blood* 2001; **97**: 130-138.
- Arruda VR, Schuettrumpf J, Herzog RW *et al.* Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood* 2004; **103**: 85-92.
- Arruda VR, Stedman HH, Nichols TC *et al.* Regional intravascular delivery of AAV-2-F.IX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model. *Blood* 2005; **105**: 3458-3464.
- Astafieva I, Maksimova I, Lukanidin E, Alakhov V, Kabanov A. Enhancement of the polycation-mediated DNA uptake and cell transfection with Pluronic P85 block copolymer. *FEBS Lett.* 1996; **389**: 278-280.
- Ataka K, Maruyama H, Neichi T, Miyazaki J, Gejyo F. Effects of erythropoietin-gene electrotransfer in rats with adenine-induced renal failure. *Am.J.Nephrol.* 2003; **23**: 315-323.
- Bachrach E, Perez AL, Choi YH *et al.* Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation. *Muscle Nerve* 2006; **34**: 44-52.
- Bainbridge JW, Mistry A, Binley K *et al.* Hypoxia-regulated transgene expression in experimental retinal and choroidal neovascularization. *Gene Ther.* 2003; **10**: 1049-1054.
- Baron U, Gossen M, Bujard H. Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res.* 1997; **25**: 2723-2729.
- Baron U, Bujard H. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol.* 2000; **327**: 401-421.
- Barry ME, Pinto-Gonzalez D, Orson FM, McKenzie GJ, Petry GR, Barry MA. Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Hum.Gene Ther.* 1999; **10**: 2461-2480.
- Bartlett RJ, Stockinger S, Denis MM *et al.* In vivo targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide. *Nat.Biotechnol.* 2000; **18**: 615-622.
- Bartoli M, Poupiot J, Goyenvallé A *et al.* Noninvasive monitoring of therapeutic gene transfer in animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther.* 2006; **13**: 20-28.

- Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J.Clin.Invest* 1999; **104**: 375-381.
- Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY, Kabanov AV. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *Br.J.Cancer* 2001; **85**: 1987-1997.
- Batrakova EV, Li S, Vinogradov SV, Alakhov VY, Miller DW, Kabanov AV. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2001; **299**: 483-493.
- Batrakova EV, Li S, Alakhov VY, Miller DW, Kabanov AV. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2003; **304**: 845-854.
- Baumgartner I, Pieczek A, Manor O *et al.* Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; **97**: 1114-1123.
- Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J.Cell Biol.* 1999; **144**: 1113-1122.
- Benoit PW, Belt WD. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J.Anat.* 1970; **107**: 547-556.
- Benoit PW, Belt WD. Some effects of local anesthetic agents on skeletal muscle. *Exp.Neurol.* 1972; **34**: 264-278.
- Bergelson JM, Krithivas A, Celi L *et al.* The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J.Virol.* 1998; **72**: 415-419.
- Bertoni C, Rando TA. Dystrophin gene repair in mdx muscle precursor cells in vitro and in vivo mediated by RNA-DNA chimeric oligonucleotides. *Hum.Gene Ther.* 2002; **13**: 707-718.
- Bettan M, Emmanuel F, Darteil R *et al.* High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Mol.Ther.* 2000; **2**: 204-210.
- Binley K, Iqball S, Kingsman A, Kingsman S, Naylor S. An adenoviral vector regulated by hypoxia for the treatment of ischaemic disease and cancer. *Gene Ther.* 1999; **6**: 1721-1727.

- Binley K, Askham Z, Iqball S *et al.* Long-term reversal of chronic anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. *Blood* 2002; **100**: 2406-2413.
- Binley K, Askham Z, Martin L *et al.* Hypoxia-mediated tumour targeting. *Gene Ther.* 2003; **10**: 540-549.
- Bischoff R. Regeneration of single skeletal muscle fibers in vitro. *Anat.Rec.* 1975; **182**: 215-235.
- Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K *et al.* Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat.Embryol.(Berl)* 1999; **199**: 391-396.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002; **82**: 291-329.
- Blau HM, Webster C, Pavlath GK. Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1983; **80**: 4856-4860.
- Blaveri K, Heslop L, Yu DS *et al.* Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: studies on isolated fibers. *Dev.Dyn.* 1999; **216**: 244-256.
- Boast K, Binley K, Iqball S *et al.* Characterization of physiologically regulated vectors for the treatment of ischemic disease. *Hum.Gene Ther.* 1999; **10**: 2197-2208.
- Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER *et al.* Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 2002; **420**: 418-421.
- Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TO, Khurana TS. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. *J.Mol.Med.* 2004; **82**: 102-115.
- Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TO, Whittemore LA, Khurana TS. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J.* 2005; **19**: 543-549.
- Bohl D, Naffakh N, Heard JM. Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat.Med.* 1997; **3**: 299-305.
- Bohl D, Salvetti A, Moullier P, Heard JM. Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector. *Blood* 1998; **92**: 1512-1517.
- Bonafous P, Vernhes M, Teissie J, Gabriel B. The generation of reactive-oxygen species associated with long-lasting pulse-induced electropermeabilisation of mammalian cells is based on a



- non-destructive alteration of the plasma membrane. *Biochim.Biophys.Acta* 1999; **1461**: 123-134.
- Bonucci G, Sotgia F, Schubert W *et al.* Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. *Am.J.Pathol.* 2003; **163**: 1663-1675.
- Borrelli MJ, Schoenherr DM, Wong A, Bernock LJ, Corry PM. Heat-activated transgene expression from adenovirus vectors infected into human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2001; **61**: 1113-1121.
- Bou-Gharios G, Wells DJ, Lu QL, Morgan JE, Partridge T. Differential expression and secretion of alpha 1 anti-trypsin between direct DNA injection and implantation of transfected myoblast. *Gene Ther.* 1999; **6**: 1021-1029.
- Boven K, Knight J, Bader F, Rossert J, Eckardt KU, Casadevall N. Epoetin-associated pure red cell aplasia in patients with chronic kidney disease: solving the mystery. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2005; **20 Suppl 3**: iii33-iii40.
- Boven K, Stryker S, Knight J *et al.* The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes. *Kidney Int.* 2005; **67**: 2346-2353.
- Brade AM, Ngo D, Szmítko P, Li PX, Liu FF, Klamut HJ. Heat-directed gene targeting of adenoviral vectors to tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 2000; **7**: 1566-1574.
- Braun S. Naked plasmid DNA for the treatment of muscular dystrophy. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 2004; **6**: 499-505.
- Brigham KL, Lane KB, Meyrick B *et al.* Transfection of nasal mucosa with a normal alpha1-antitrypsin gene in alpha1-antitrypsin-deficient subjects: comparison with protein therapy. *Hum.Gene Ther.* 2000; **11**: 1023-1032.
- Bromberg JS, Debruyne LA, Qin L. Interactions between the immune system and gene therapy vectors: bidirectional regulation of response and expression. *Adv.Immunol.* 1998; **69**: 353-409.
- Brown PA, Davis WC, Draghia-Akli R. Immune-enhancing effects of growth hormone-releasing hormone delivered by plasmid injection and electroporation. *Mol.Ther.* 2004; **10**: 644-651.
- Browning J, Hogg N, Gobe G, Cross R. Capillary density in skeletal muscle of Wistar rats as a function of muscle weight and body weight. *Microvasc.Res.* 1996; **52**: 281-287.

- Budker V, Zhang G, Danko I, Williams P, Wolff J. The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Ther.* 1998; **5**: 272-276.
- Budker V, Budker T, Zhang G, Subbotin V, Loomis A, Wolff JA. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J.Gene Med.* 2000; **2**: 76-88.
- Budker VG, Subbotin VM, Budker T, Sebestyén MG, Zhang G, Wolff JA. Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. II. Morphological studies. *J.Gene Med.* 2006; **8**: 874-888.
- Burcin MM, Schiedner G, Kochanek S, Tsai SY, O'Malley BW. Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; **96**: 355-360.
- Bureau MF, Gehl J, Deleuze V, Mir LM, Scherman D. Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim.Biophys.Acta* 2000; **1474**: 353-359.
- Bureau MF, Naimi S, Torero IR *et al.* Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation. *Biochim.Biophys.Acta* 2004; **1676**: 138-148.
- Buttrick PM, Kass A, Kitsis RN, Kaplan ML, Leinwand LA. Behavior of genes directly injected into the rat heart in vivo. *Circ.Res.* 1992; **70**: 193-198.
- Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat.Med.* 2003; **9**: 1520-1527.
- Cao B, Pruchnic R, Ikezawa M *et al.* The role of receptors in the maturation-dependent adenoviral transduction of myofibers. *Gene Ther.* 2001; **8**: 627-637.
- Cappelletti M, Zampaglione I, Rizzuto G, Ciliberto G, La Monica N, Fattori E. Gene electro-transfer improves transduction by modifying the fate of intramuscular DNA. *J.Gene Med.* 2003; **5**: 324-332.
- Carlson BM. Regeneration of entire skeletal muscles. *Fed.Proc.* 1986; **45**: 1456-1460.
- Caron A, Michelet S, Caron A *et al.* Human FGF-1 gene transfer promotes the formation of collateral vessels and arterioles in ischemic muscles of hypercholesterolemic hamsters. *J.Gene Med.* 2004; **6**: 1033-1045.
- Carnot, P. Deflandre. Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang. *C R Acad Sci (Paris)* 1906; **143**: 384-386.

- Carpenter JL, Hoffman EP, Romanul FC *et al.* Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am.J.Pathol.* 1989; **135**: 909-919.
- Casadevall N. Antibodies against rHuEPO: native and recombinant. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2002a; **17 Suppl 5**: 42-47.
- Casadevall N, Nataf J, Viron B *et al.* Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N.Engl.J.Med.* 2002b; **346**: 469-475.
- Casadevall N. Pure red cell aplasia and anti-erythropoietin antibodies in patients treated with epoetin. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2003; **18 Suppl 8**: viii37-viii41.
- Cavazzana-Calvo M, Bagnis C, Mannoni P, Fischer A. Peripheral stem cells in bone marrow transplantation. Peripheral blood stem cell and gene therapy. Baillieres *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 1999; **12**: 129-138.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Yates F, de Villartay JP, Le Deist F, Fischer A. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J.Gene Med.* 2001; **3**: 201-206.
- Chang SF, Chang HY, Tong YC *et al.* Nonionic polymeric micelles for oral gene delivery in vivo. *Hum.Gene Ther.* 2004; **15**: 481-493.
- Chen R, Meseck ML, Woo SL. Auto-regulated hepatic insulin gene expression in type 1 diabetic rats. *Mol.Ther.* 2001; **3**: 584-590.
- Chen YC, Liang HD, Zhang QP, Blomley MJ, Lu QL. Pluronic block copolymers: novel functions in ultrasound-mediated gene transfer and against cell damage. *Ultrasound Med.Biol.* 2006; **32**: 131-137.
- Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol.Ther.* 2003; **8**: 495-500.
- Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE *et al.* Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol.Ther.* 2004a; **9**: 410-418.
- Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE *et al.* Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* 2004b; **103**: 3303-3304.
- Christopherson KS, Mark MR, Bajaj V, Godowski PJ. Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; **89**: 6314-6318.

- Clackson T. Regulated gene expression systems. *Gene Ther.* 2000; **7**: 120-125.
- Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; **16**: 31-41.
- Cohen L, Morgan J, Babbs R, Gilula Z, Karrison T, Meier P. A statistical analysis of the loss of muscle strength in Duchenne's muscular dystrophy. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 1982; **37**: 123-138.
- Comerota AJ, Throm RC, Miller KA *et al.* Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J.Vasc.Surg.* 2002; **35**: 930-936.
- Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H *et al.* The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 1988; **334**: 154-156.
- Corbel SY, Lee A, Yi L *et al.* Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat.Med.* 2003; **9**: 1528-1532.
- Cossu G, Mavilio F. Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? *J.Clin.Invest* 2000; **105**: 1669-1674.
- Cox GA, Phelps SF, Chapman VM, Chamberlain JS. New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nat.Genet.* 1993; **4**: 87-93.
- Croze F, Prud'homme GJ. Gene therapy of streptozotocin-induced diabetes by intramuscular delivery of modified preproinsulin genes. *J.Gene Med.* 2003; **5**: 425-437.
- Cruzado JM, Lloberas N, Torras J *et al.* Regression of advanced diabetic nephropathy by hepatocyte growth factor gene therapy in rats. *Diabetes* 2004; **53**: 1119-1127.
- Dachs GU, Dougherty GJ, Stratford IJ, Chaplin DJ. Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol.Res.* 1997; **9**: 313-325.
- Dalle B, Payen E, Beuzard Y. Modulation of transduced erythropoietin expression by iron. *Exp.Hematol.* 2000; **28**: 760-764.
- Danielou G, Comtois AS, Dudley RW *et al.* Ultrasound increases plasmid-mediated gene transfer to dystrophic muscles without collateral damage. *Mol.Ther.* 2002; **6**: 687-693.
- Danko I, Fritz JD, Jiao S, Hogan K, Latendresse JS, Wolff JA. Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle. *Gene Ther.* 1994; **1**: 114-121.

- Danko I, Williams P, Herweijer H *et al.* High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents. *Hum.Mol.Genet.* 1997; **6**: 1435-1443.
- Darquet AM, Rangara R, Kreiss P *et al.* Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer. *Gene Ther.* 1999; **6**: 209-218.
- Darteil R, Wang M, Latta-Mahieu M *et al.* Efficient gene regulation by PPAR gamma and thiazolidinediones in skeletal muscle and heart. *Mol.Ther.* 2002; **6**: 265-271.
- Davis HL, Whalen RG, Demeneix BA. Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum.Gene Ther.* 1993a; **4**: 151-159.
- Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, Coulombe J, Whalen RG. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum.Gene Ther.* 1993b; **4**: 733-740.
- De Gennes PG. Passive entry of a DNA molecule into a small pore. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; **96**: 7262-7264.
- Decrouy A, Renaud JM, Lunde JA, Dickson G, Jasmin BJ. Mini- and full-length dystrophin gene transfer induces the recovery of nitric oxide synthase at the sarcolemma of mdx4cv skeletal muscle fibers. *Gene Ther.* 1998; **5**: 59-64.
- Delort JP, Capecchi MR. TAXI/UAS: A molecular switch to control expression of genes in vivo. *Hum.Gene Ther.* 1996; **7**: 809-820.
- Deng CX, Sieling F, Pan H, Cui J. Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med.Biol.* 2004; **30**: 519-526.
- Denti MA, Rosa A, D'Antona G *et al.* Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. *Hum.Gene Ther.* 2006; **17**: 565-574.
- Desigaux L, Gourden C, Bello-Roufai M *et al.* Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung. *Hum.Gene Ther.* 2005; **16**: 821-829.
- DiMario J, Buffinger N, Yamada S, Strohmman RC. Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science* 1989; **244**: 688-690.

- Dishart KL, Denby L, George SJ *et al.* Third-generation lentivirus vectors efficiently transduce and phenotypically modify vascular cells: implications for gene therapy. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2003; **35**: 739-748.
- Donello JE, Loeb JE, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J.Virol.* 1998; **72**: 5085-5092.
- Draghia-Akli R, Fiorotto ML, Hill LA, Malone PB, Deaver DR, Schwartz RJ. Myogenic expression of an injectable protease-resistant growth hormone-releasing hormone augments long-term growth in pigs. *Nat.Biotechnol.* 1999; **17**: 1179-1183.
- Draghia-Akli R, Hahn KA, King GK, Cummings KK, Carpenter RH. Effects of plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone in severely debilitated dogs with cancer. *Mol.Ther.* 2002a; **6**: 830-836.
- Draghia-Akli R, Malone PB, Hill LA, Ellis KM, Schwartz RJ, Nordstrom JL. Enhanced animal growth via ligand-regulated GHRH myogenic-injectable vectors. *FASEB J.* 2002b; **16**: 426-428.
- Draghia-Akli R, Ellis KM, Hill LA, Malone PB, Fiorotto ML. High-efficiency growth hormone-releasing hormone plasmid vector administration into skeletal muscle mediated by electroporation in pigs. *FASEB J.* 2003a; **17**: 526-528.
- Draghia-Akli R, Cummings KK, Khan AS, Brown PA, Carpenter RH. Effects of plasmid-mediated growth hormone releasing hormone supplementation in young, healthy Beagle dogs. *J.Anim Sci.* 2003b; **81**: 2301-2310.
- Draghia-Akli R, Fiorotto ML. A new plasmid-mediated approach to supplement somatotropin production in pigs. *J.Anim Sci.* 2004; **82 E-Suppl**: E264-E269.
- Draghia-Akli R, Pope MA, Brown PA, Khan AS. Plasmid-based expression technology using growth hormone releasing hormone: a novel method for physiologically stimulating long-term growth hormone secretion. *Comb.Chem.High Throughput.Screen.* 2006; **9**: 181-185.
- Dunant P, Walter MC, Karpati G, Lochmuller H. Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. *Muscle Nerve* 2003; **27**: 624-627.
- Durieux AC, Bonnefoy R, Busso T, Freyssenet D. In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle: effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage. *J.Gene Med.* 2004; **6**: 809-816.

- Eckardt KU, Casadevall N. Pure red-cell aplasia due to anti-erythropoietin antibodies. *Nephrol.Dial.Transplant.* 2003; **18**: 865-869.
- Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J.Gene Med.* 2004; **6**: 597-602.
- Engel AG, Biesecker G. Complement activation in muscle fiber necrosis: demonstration of the membrane attack complex of complement in necrotic fibers. *Ann.Neurol.* 1982; **12**: 289-296.
- Erslev AJ. Erythropoietin. *N.Engl.J.Med.* 1991; **324**: 1339-1344.
- Erukova VY, Krylova OO, Antonenko YN, Melik-Nubarov NS. Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin. *Biochim.Biophys.Acta* 2000; **1468**: 73-86.
- Everett RS, Gerrard DE, Grant AL. Factors affecting production of luciferase and epitope-tagged IGF-I in porcine muscle after DNA injection. *J.Endocrinol.* 2000; **166**: 255-263.
- Fabre EE, Bigey P, Orsini C, Scherman D. Comparison of promoter region constructs for in vivo intramuscular expression. *J.Gene Med.* 2006; **8**: 636-645.
- Fall AM, Johnsen R, Honeyman K, Iversen P, Fletcher S, Wilton SD. Induction of revertant fibres in the mdx mouse using antisense oligonucleotides. *Genet.Vaccines.Ther.* 2006; **4**: 3.
- Fattori E, Cappelletti M, Zampaglione I *et al.* Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates. *J.Gene Med.* 2005; **7**: 228-236.
- Faurie C, Phez E, Golzio M *et al.* Effect of electric field vectoriality on electrically mediated gene delivery in mammalian cells. *Biochim.Biophys.Acta* 2004; **1665**: 92-100.
- Favre D, Cherel Y, Provost N *et al.* Hyaluronidase enhances recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer in the rat skeletal muscle. *Gene Ther.* 2000; **7**: 1417-1420.
- Favre D, Blouin V, Provost N *et al.* Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J.Virol.* 2002; **76**: 11605-11611.
- Fechheimer M, Boylan JF, Parker S, Siskin JE, Patel GL, Zimmer SG. Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987; **84**: 8463-8467.

- Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN *et al.* Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J.Biol.Chem.* 1994; **269**: 2550-2561.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; **279**: 1528-1530.
- Fewell JG, MacLaughlin F, Mehta V *et al.* Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroporation. *Mol.Ther.* 2001; **3**: 574-583.
- Fischer A, Hacein-Bey S, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Nat.Rev.Immunol.* 2002; **2**: 615-621.
- Fletcher S, Honeyman K, Fall AM, Harding PL, Johnsen RD, Wilton SD. Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide. *J.Gene Med.* 2006; **8**: 207-216.
- Franquesa M, Alperovich G, Herrero-Fresneda I *et al.* Direct electrotransfer of hHGF gene into kidney ameliorates ischemic acute renal failure. *Gene Ther.* 2005; **12**: 1551-1558.
- Freundlieb S, Schirra-Muller C, Bujard H. A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J.Gene Med.* 1999; **1**: 4-12.
- Fussenegger M. The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol.Prog.* 2001; **17**: 1-51.
- Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR *et al.* Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J.Virol.* 2004a; **78**: 6381-6388.
- Gao G, Leberherz C, Weiner DJ *et al.* Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques. *Blood* 2004b; **103**: 3300-3302.
- Gao G, Lu Y, Calcedo R *et al.* Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates. *Mol.Ther.* 2006; **13**: 77-87.
- Gardner-Medwin D. Rehabilitation in muscular dystrophy. *Int.Rehabil.Med.* 1980; **2**: 104-110.
- Gaschen FP, Hoffman EP, Gorospe JR *et al.* Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J.Neurol.Sci.* 1992; **110**: 149-159.
- Gassmann M, Heinicke K, Soliz J *et al.* Non-erythroid functions of erythropoietin. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2003; **543**: 323-330.



- Gebhart CL, Sriadibhatla S, Vinogradov S, Lemieux P, Alakhov V, Kabanov AV. Design and formulation of polyplexes based on pluronic-polyethyleneimine conjugates for gene transfer. *Bioconjug.Chem.* 2002; **13**: 937-944.
- Gebiski BL, Mann CJ, Fletcher S, Wilton SD. Morpholino antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 23 skipping in mdx mouse muscle. *Hum.Mol.Genet.* 2003; **12**: 1801-1811.
- Gehl J, Sorensen TH, Nielsen K *et al.* In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim.Biophys.Acta* 1999; **1428**: 233-240.
- Ginhoux F, Turbant S, Gross DA *et al.* HLA-A\*0201-restricted cytolytic responses to the rTA transactivator dominant and cryptic epitopes compromise transgene expression induced by the tetracycline on system. *Mol.Ther.* 2004; **10**: 279-289.
- Go WY, Ho SN. Optimization and direct comparison of the dimerizer and reverse tet transcriptional control systems. *J.Gene Med.* 2002; **4**: 258-270.
- Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; **96**: 5177-5181.
- Gollins H, McMahon J, Wells KE, Wells DJ. High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle. *Gene Ther.* 2003; **10**: 504-512.
- Golzio M, Teissie J, Rols MP. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002; **99**: 1292-1297.
- Golzio M, Rols MP, Teissie J. In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. *Methods* 2004; **33**: 126-135.
- Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992; **89**: 5547-5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 1995; **268**: 1766-1769.
- Gould DJ, Chernajovsky Y. Endogenous GATA factors bind the core sequence of the tetO and influence gene regulation with the tetracycline system. *Mol.Ther.* 2004; **10**: 127-138.
- Goyenvalle A, Vulin A, Fougerousse F *et al.* Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004; **306**: 1796-1799.

- Greelish JP, Su LT, Lankford EB *et al.* Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector. *Nat.Med.* 1999; **5**: 439-443.
- Greenebaum B, Blossfield K, Hannig J *et al.* Poloxamer 188 prevents acute necrosis of adult skeletal muscle cells following high-dose irradiation. *Burns* 2004; **30**: 539-547.
- Greenwood MC, Dillon MJ, Simmonds HA, Barratt TM, Pincott JR, Metreweli C. Renal failure due to 2,8-dihydroxyadenine urolithiasis. *Eur.J.Pediatr.* 1982; **138**: 346-349.
- Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol.Res.Pract.* 1991; **187**: 1-22.
- Gussoni E, Pavlath GK, Lanctot AM *et al.* Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 1992; **356**: 435-438.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD *et al.* Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; **401**: 390-394.
- Gussoni E, Bennett RR, Muskiewicz KR *et al.* Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J.Clin.Invest* 2002; **110**: 807-814.
- Hackett PB, Ekker SC, Largaespada DA, McIvor RS. Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression. *Adv.Genet.* 2005; **54**: 189-232.
- Hagstrom JE, Rybakova IN, Staeva T, Wolff JA, Ervasti JM. Nonnuclear DNA binding proteins in striated muscle. *Biochem.Mol.Med.* 1996; **58**: 113-121.
- Hagstrom JE, Hegge J, Zhang G *et al.* A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol.Ther.* 2004; **10**: 386-398.
- Hallahan DE, Mauceri HJ, Seung LP *et al.* Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. *Nat.Med.* 1995; **1**: 786-791.
- Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. *Clin.Cancer Res.* 2006; **12**: 332-339.
- Hartikka J, Bozoukova V, Jones D *et al.* Sodium phosphate enhances plasmid DNA expression in vivo. *Gene Ther.* 2000; **7**: 1171-1182.

- Hartikka J, Sukhu L, Buchner C *et al.* Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol. Ther.* 2001; **4**: 407-415.
- Heinicke K, Baum O, Ogunshola OO, Vogel J, Stallmach T, Wolfer DP, Keller S, Weber, K. Wagner PD, Gassmann M, Djonov V. Excessive erythrocytosis in adult mice overexpressing erythropoietin leads to hepatic, renal, neuronal and muscular degeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 May 11; [Epub ahead of print]
- Herzog RW, Fields PA, Arruda VR *et al.* Influence of vector dose on factor IX-specific T and B cell responses in muscle-directed gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 2002; **13**: 1281-1291.
- Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH *et al.* Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N.Engl.J.Med.* 1988; **318**: 1363-1368.
- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchene muscular dystrophy locus. 1987. *Biotechnology* 1992; **24**: 457-466.
- Houk BE, Martin R, Hochhaus G, Hughes JA. Pharmacokinetics of plasmid DNA in the rat. *Pharm. Res.* 2001; **18**: 67-74.
- Huang Q, Hu JK, Lohr F *et al.* Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy. *Cancer Res.* 2000; **60**: 3435-3439.
- Huard J, Bouchard JP, Roy R *et al.* Human myoblast transplantation: preliminary results of 4 cases. *Muscle Nerve* 1992; **15**: 550-560.
- Huard J, Cao B, Qu-Petersen Z. Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* 2003; **69**: 230-237.
- Hunter RL, Bennett B. The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. II. Antibody formation and inflammation related to the structure of triblock and octablock copolymers. *J. Immunol.* 1984; **133**: 3167-3175.
- Imren S, Payen E, Westerman KA *et al.* Permanent and panerythroid correction of murine beta thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2002; **99**: 14380-14385.
- Ingram DA, Forman MB, Murray JJ. Phagocytic activation of human neutrophils by the detergent component of fluosol. *Am. J. Pathol.* 1992; **140**: 1081-1087.

- Iyengar S, Abraham WT. Anemia in chronic heart failure: can EPO reduce deaths? *Cleve.Clin.J.Med.* 2005; **72**: 1027-1032.
- Jackson MJ, Jones DA, Edwards RH. Experimental skeletal muscle damage: the nature of the calcium-activated degenerative processes. *Eur.J.Clin.Invest* 1984; **14**: 369-374.
- Jang HS, Kim HJ, Kim JM *et al.* A novel ex vivo angiogenesis assay based on electroporation-mediated delivery of naked plasmid DNA to skeletal muscle. *Mol.Ther.* 2004; **9**: 464-474.
- Jiao S, Williams P, Berg RK *et al.* Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers in vivo. *Hum.Gene Ther.* 1992; **3**: 21-33.
- Jones GH. Protein synthesis in bupivacaine (marcaine)-treated, regenerating skeletal muscle. *Muscle Nerve* 1982; **5**: 281-290.
- Jorgensen AM, Kristensen SM, Led JJ, Balschmidt P. Three-dimensional solution structure of an insulin dimer. A study of the B9(Asp) mutant of human insulin using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *J.Mol.Biol.* 1992; **227**: 1146-1163.
- Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J.Control Release* 2002; **82**: 189-212.
- Kabanov AV, Batrakova EV, Sriadibhatla S, Yang Z, Kelly DL, Alakov VY. Polymer genomics: shifting the gene and drug delivery paradigms. *J.Control Release* 2005; **101**: 259-271.
- Kapsa R, Quigley A, Lynch GS *et al.* In vivo and in vitro correction of the mdx dystrophin gene nonsense mutation by short-fragment homologous replacement. *Hum.Gene Ther.* 2001; **12**: 629-642.
- Karpati G, Acsadi G. The potential for gene therapy in Duchenne muscular dystrophy and other genetic muscle diseases. *Muscle Nerve* 1993; **16**: 1141-1153.
- Khan AS, Anscombe IW, Cummings KK, Pope MA, Smith LC, Draghia-Akli R. Effects of plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone supplementation on LL-2 adenocarcinoma in mice. *Mol.Ther.* 2003; **8**: 459-466.
- Khan AS, Brown PA, Draghia-Akli R. Plasmid-based growth hormone-releasing hormone supplementation and its applications. *Curr.Opin.Mol.Ther.* 2005a; **7**: 306-316.

- Khan AS, Smith LC, Anscombe IW, Cummings KK, Pope MA, Draghia-Akli R. Growth hormone releasing hormone plasmid supplementation, a potential treatment for cancer cachexia, does not increase tumor growth in nude mice. *Cancer Gene Ther.* 2005b; **12**: 54-60.
- Khurana TS, Davies KE. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2003; **2**: 379-390.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F *et al.* Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996; **93**: 10933-10938.
- Klenchin VA, Sukharev SI, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev Y. Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys.J.* 1991; **60**: 804-811.
- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; **53**: 219-226.
- Komamura K, Tatsumi R, Miyazaki J *et al.* Treatment of dilated cardiomyopathy with electroporation of hepatocyte growth factor gene into skeletal muscle. *Hypertension* 2004; **44**: 365-371.
- Kon OL, Sivakumar S, Teoh KL, Lok SH, Long YC. Naked plasmid-mediated gene transfer to skeletal muscle ameliorates diabetes mellitus. *J.Gene Med.* 1999; **1**: 186-194.
- Krieg AM. Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy. *J.Gene Med.* 1999; **1**: 56-63.
- Krieg AM. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat.Med.* 2003; **9**: 831-835.
- Krylova OO, Melik-Nubarov NS, Badun GA, Ksenofontov AL, Menger FM, Yaroslavov AA. Pluronic L61 accelerates flip-flop and transbilayer doxorubicin permeation. *Chemistry.* 2003; **9**: 3930-3936.
- Krylova OO, Pohl P. Ionophoric activity of pluronic block copolymers. *Biochemistry* 2004; **43**: 3696-3703.
- Kuo JH. Effect of Pluronic-block copolymers on the reduction of serum-mediated inhibition of gene transfer of polyethyleneimine-DNA complexes. *Biotechnol.Appl.Biochem.* 2003; **37**: 267-271.

- Lamartina S, Silvi L, Roscilli G *et al.* Construction of an rtTA2(s)-m2/tts(kid)-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates. *Mol. Ther.* 2003; **7**: 271-280.
- Lasne F, Martin L, de Ceaurriz J, Larcher T, Moullier P, Chenuaud P. "Genetic Doping" with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol. Ther.* 2004; **10**: 409-410.
- Latta-Mahieu M, Rolland M, Caillet C *et al.* Gene transfer of a chimeric trans-activator is immunogenic and results in short-lived transgene expression. *Hum. Gene Ther.* 2002; **13**: 1611-1620.
- Le Bec C, Allo V, and Danos O. (1999). In vitro selection of RNA for drug-dependent regulation of gene expression. *Nucleic Acids Symp Ser, Information Retrieval, Londres*, 215-216
- Le Grand F, Auda-Boucher G, Levitsky D, Rouaud T, Fontaine-Perus J, Gardahaut MF. Endothelial cells within embryonic skeletal muscles: a potential source of myogenic progenitors. *Exp. Cell Res.* 2004; **301**: 232-241.
- Lederfein D, Levy Z, Augier N *et al.* A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1992; **89**: 5346-5350.
- Lee-Pullen TF, Grounds MD. Muscle-derived stem cells: implications for effective myoblast transfer therapy. *IUBMB. Life* 2005; **57**: 731-736.
- Lee HC, Kim SJ, Kim KS, Shin HC, Yoon JW. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 2000; **408**: 483-488.
- Lee RC, River LP, Pan FS, Ji L, Wollmann RL. Surfactant-induced sealing of electroporated skeletal muscle membranes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1992; **89**: 4524-4528.
- Lemieux P, Guerin N, Paradis G *et al.* A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther.* 2000; **7**: 986-991.
- Levy MY, Barron LG, Meyer KB, Szoka FC, Jr. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther.* 1996; **3**: 201-211.
- Li X, Eastman EM, Schwartz RJ, Draghia-Akli R. Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat. Biotechnol.* 1999; **17**: 241-245.

- Liang HD, Lu QL, Xue SA *et al.* Optimisation of ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in skeletal muscle cells. *Ultrasound Med.Biol.* 2004b; **30**: 1523-1529.
- Liang KW, Nishikawa M, Liu F, Sun B, Ye Q, Huang L. Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA. *Gene Ther.* 2004a; **11**: 901-908.
- Liaw J, Chang SF, Hsiao FC. In vivo gene delivery into ocular tissues by eye drops of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) polymeric micelles. *Gene Ther.* 2001; **8**: 999-1004.
- Lin H, Blank M, Rossol-Haseroth K, Goodman R. Regulating genes with electromagnetic response elements. *J.Cell Biochem.* 2001; **81**: 143-148.
- Lippin Y, Dranitzki-Elhalel M, Brill-Almon E *et al.* Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure. *Blood* 2005; **106**: 2280-2286.
- Liu F, Nishikawa M, Clemens PR, Huang L. Transfer of full-length Dmd to the diaphragm muscle of Dmd(mdx/mdx) mice through systemic administration of plasmid DNA. *Mol.Ther.* 2001; **4**: 45-51.
- Locatelli F, Pisoni RL, Combe C *et al.* Anaemia in haemodialysis patients of five European countries: association with morbidity and mortality in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol.Dial.Transplant.* 2004; **19**: 121-132.
- Loeb JE, Cordier WS, Harris ME, Weitzman MD, Hope TJ. Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum.Gene Ther.* 1999; **10**: 2295-2305.
- Long YC, Jaichandran S, Ho LP, Tien SL, Tan SY, Kon OL. FVIII gene delivery by muscle electroporation corrects murine hemophilia A. *J.Gene Med.* 2005; **7**: 494-505.
- Lu QL, Morris GE, Wilton SD, Ly T, Artem'yeva OV, Stong P, and Partridge TA. Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *J. of Cell Biology* 2000; **148** : 985-995
- Lu QL, Mann CJ, Lou F *et al.* Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat.Med.* 2003b; **9**: 1009-1014.

- Lu QL, Liang HD, Partridge T, Blomley MJ. Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther.* 2003a; **10**: 396-405.
- Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC *et al.* Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005; **102**: 198-203.
- Magari SR, Rivera VM, Iuliucci JD, Gilman M, Cerasoli F, Jr. Pharmacologic control of a humanized gene therapy system implanted into nude mice. *J.Clin.Invest* 1997; **100**: 2865-2872.
- Maillard L, Van Belle E, Tio FO *et al.* Effect of percutaneous adenovirus-mediated Gax gene delivery to the arterial wall in double-injured atheromatous stented rabbit iliac arteries. *Gene Ther.* 2000; **7**: 1353-1361.
- Mann CJ, Honeyman K, Cheng AJ *et al.* Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001; **98**: 42-47.
- Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J *et al.* Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum.Gene Ther.* 1993; **4**: 419-431.
- March KL, Madison JE, Trapnell BC. Pharmacokinetics of adenoviral vector-mediated gene delivery to vascular smooth muscle cells: modulation by poloxamer 407 and implications for cardiovascular gene therapy. *Hum.Gene Ther.* 1995; **6**: 41-53.
- Marsden JT. Erythropoietin-- measurement and clinical applications. *Ann.Clin.Biochem.* 2006; **43**: 97-104.
- Martinenghi S, Cusella DA, Biressi S *et al.* Human insulin production and amelioration of diabetes in mice by electrotransfer-enhanced plasmid DNA gene transfer to the skeletal muscle. *Gene Ther.* 2002; **9**: 1429-1437.
- Maruyama H, Sugawa M, Moriguchi Y *et al.* Continuous erythropoietin delivery by muscle-targeted gene transfer using in vivo electroporation. *Hum.Gene Ther.* 2000; **11**: 429-437.
- Maruyama H, Ataka K, Gejyo F *et al.* Long-term production of erythropoietin after electroporation-mediated transfer of plasmid DNA into the muscles of normal and uremic rats. *Gene Ther.* 2001; **8**: 461-468.



- Maskarinec SA, Hannig J, Lee RC, Lee KY. Direct observation of poloxamer 188 insertion into lipid monolayers. *Biophys.J.* 2002; **82**: 1453-1459.
- Mayo KE, Warren R, Palmiter RD. The mouse metallothionein-I gene is transcriptionally regulated by cadmium following transfection into human or mouse cells. *Cell* 1982; **29**: 99-108.
- McCloy G, Moulton HM, Iversen PL, Fletcher S, Wilton SD. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther.* 2006.
- McGee Sanftner LH, Rendahl KG, Quiroz D *et al.* Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina. *Mol.Ther.* 2001; **3**: 688-696.
- McMahon JM, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ. Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase -- increased expression with reduced muscle damage. *Gene Ther.* 2001; **8**: 1264-1270.
- Mendell JR, Kissel JT, Amato AA *et al.* Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N.Engl.J.Med.* 1995; **333**: 832-838.
- Menezes KM, Mok HS, Barry MA. Increased transduction of skeletal muscle cells by fibroblast growth factor-modified adenoviral vectors. *Hum.Gene Ther.* 2006; **17**: 314-320.
- Meng QY, Chen ZQ, Yu ZQ, Xie QF, Li N. Increased body weight via injecting myogenic expression growth hormone-releasing hormone (GHRH) plasmid DNA into sheep. *Anim Biotechnol.* 2004; **15**: 175-192.
- Mennuni C, Calvaruso F, Zampaglione I *et al.* Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle. *Hum.Gene Ther.* 2002; **13**: 355-365.
- Merly F, Huard C, Asselin I, Robbins PD, Tremblay JP. Anti-inflammatory effect of transforming growth factor-beta1 in myoblast transplantation. *Transplantation* 1998; **65**: 793-799.
- Mir LM, Bureau MF, Gehl J *et al.* High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; **96**: 4262-4267.
- Mizuguchi H, Xu ZL, Sakurai F, Mayumi T, Hayakawa T. Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing the rtTA and tTS expression cassettes in separate genome regions. *Hum.Gene Ther.* 2003; **14**: 1265-1277.
- Mizui M, Isaka Y, Takabatake Y *et al.* Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2004; **65**: 2041-2053.

- Moghimi SM, Gray T. A single dose of intravenously injected poloxamine-coated long-circulating particles triggers macrophage clearance of subsequent doses in rats. *Clin.Sci.(Lond)* 1997; **93**: 371-379.
- Moghimi SM, Hunter AC. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol.* 2000; **18**: 412-420.
- Molnar MJ, Gilbert R, Lu Y *et al.* Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. *Mol.Ther.* 2004; **10**: 447-455.
- Morishita R, Aoki M, Hashiya N *et al.* Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension* 2004; **44**: 203-209.
- Mouly V, Aamiri A, Perie S *et al.* Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol.* 2005; **24**: 128-133.
- Mumper RJ, Duguid JG, Anwer K, Barron MK, Nitta H, Rolland AP. Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm.Res.* 1996; **13**: 701-709.
- Mumper RJ, Wang J, Klakamp SL *et al.* Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle. *J.Control Release* 1998; **52**: 191-203.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1982; **1**: 841-845.
- Nicol F, Wong M, MacLaughlin FC *et al.* Poly-L-glutamate, an anionic polymer, enhances transgene expression for plasmids delivered by intramuscular injection with in vivo electroporation. *Gene Ther.* 2002; **9**: 1351-1358.
- Nishikage S, Koyama H, Miyata T, Ishii S, Hamada H, Shigematsu H. In vivo electroporation enhances plasmid-based gene transfer of basic fibroblast growth factor for the treatment of ischemic limb. *J.Surg.Res.* 2004; **120**: 37-46.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 1991; **108**: 193-199.
- No D, Yao TP, Evans RM. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996; **93**: 3346-3351.

- Nobile C, Marchi J, Nigro V, Roberts RG, Danieli GA. Exon-intron organization of the human dystrophin gene. *Genomics* 1997; **45**: 421-424.
- Nordstrom JL. The antiprogestin-dependent GeneSwitch system for regulated gene therapy. *Steroids* 2003; **68**: 1085-1094.
- Oh IH, Fabry ME, Humphries RK *et al.* Expression of an anti-sickling beta-globin in human erythroblasts derived from retrovirally transduced primitive normal and sickle cell disease hematopoietic cells. *Exp.Hematol.* 2004; **32**: 461-469.
- Ohlendieck K, Campbell KP. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J.Cell Biol.* 1991; **115**: 1685-1694.
- Ontell M. Morphological aspects of muscle fiber regeneration. *Fed.Proc.* 1986; **45**: 1461-1465.
- Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989; **337**: 176-179.
- Patel DJ, Suri AK, Jiang F *et al.* Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *J.Mol.Biol.* 1997; **272**: 645-664.
- Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME *et al.* Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* 2001; **294**: 2368-2371.
- Payen E, Bettan M, Henri A *et al.* Oxygen tension and a pharmacological switch in the regulation of transgene expression for gene therapy. *J.Gene Med.* 2001b; **3**: 498-504.
- Payen E, Bettan M, Rouyer-Fessard P, Beuzard Y, Scherman D. Improvement of mouse beta-thalassemia by electrotransfer of erythropoietin cDNA. *Exp.Hematol.* 2001a; **29**: 295-300.
- Payne TR, Oshima H, Sakai T *et al.* Regeneration of dystrophin-expressing myocytes in the mdx heart by skeletal muscle stem cells. *Gene Ther.* 2005; **12**: 1264-1274.
- Perrine SP. Fetal Globin Induction--Can It Cure {beta} Thalassemia? *Hematology.(Am.Soc.Hematol.Educ.Program.)* 2005; 38-44.
- Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; **90**: 3710-3714.

- Piccirillo CA, Prud'homme GJ. Immune modulation by plasmid DNA-mediated cytokine gene transfer. *Curr.Pharm.Des* 2003; **9**: 83-94.
- Pitard B, Oudrhiri N, Lambert O *et al.* Sterically stabilized BGTC-based lipoplexes: structural features and gene transfection into the mouse airways in vivo. *J.Gene Med.* 2001; **3**: 478-487.
- Pitard B, Pollard H, Agbulut O *et al.* A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum.Gene Ther.* 2002; **13**: 1767-1775.
- Pitard B, Bello-Roufai M, Lambert O, Richard P, Desigaux L, Fernandes S, Lanctin C, Pollard H, Zeghal M, Rescan PY, Escande D. Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res.* 2004 Nov **16**; **32**(20):e159
- Pollard H, Toumaniantz G, Amos JL *et al.* Ca<sup>2+</sup>-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids. *J.Gene Med.* 2001; **3**: 153-164.
- Pollock R, Rivera VM. Regulation of gene expression with synthetic dimerizers. *Methods Enzymol.* 1999; **306**: 263-281.
- Pollock R, Issner R, Zoller K, Natesan S, Rivera VM, Clackson T. Delivery of a stringent dimerizer-regulated gene expression system in a single retroviral vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; **97**: 13221-13226.
- Pollock R, Clackson T. Dimerizer-regulated gene expression. *Curr.Opin.Biotechnol.* 2002; **13**: 459-467.
- Pomerantz JL, Sharp PA, Pabo CO. Structure-based design of transcription factors. *Science* 1995; **267**: 93-96.
- Prentice H, Bishopric NH, Hicks MN *et al.* Regulated expression of a foreign gene targeted to the ischaemic myocardium. *Cardiovasc.Res.* 1997; **35**: 567-574.
- Prokop A, Kozlov E, Moore W, Davidson JM. Maximizing the in vivo efficiency of gene transfer by means of nonviral polymeric gene delivery vehicles. *J.Pharm.Sci.* 2002; **91**: 67-76.
- Prud'homme GJ. DNA vaccination against tumors. *J.Gene Med.* 2005; **7**: 3-17.
- Qin L, Ding Y, Pahud DR, Chang E, Imperiale MJ, Bromberg JS. Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression. *Hum.Gene Ther.* 1997; **8**: 2019-2029.

- Quezada A, Larson J, French M *et al.* Biodistribution and safety studies of hDel-1 plasmid-based gene therapy in mouse and rabbit models. *J.Pharm.Pharmacol.* 2004; **56**: 177-185.
- Rabinovsky ED, Draghia-Akli R. Insulin-like growth factor I plasmid therapy promotes in vivo angiogenesis. *Mol.Ther.* 2004; **9**: 46-55.
- Rando TA, Disatnik MH, Zhou LZ. Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; **97**: 5363-5368.
- Raz E, Watanabe A, Baird SM *et al.* Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; **90**: 4523-4527.
- Riera M, Chillon M, Aran JM *et al.* Intramuscular SP1017-formulated DNA electrotransfer enhances transgene expression and distributes hHGF to different rat tissues. *J.Gene Med.* 2004; **6**: 111-118.
- Rivera VM, Ye X, Courage NL *et al.* Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; **96**: 8657-8662.
- Rivera VM, Wang X, Wardwell S *et al.* Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum. *Science* 2000; **287**: 826-830.
- Rivera VM, Gao GP, Grant RL *et al.* Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 2005; **105**: 1424-1430.
- Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D *et al.* Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; **96**: 6417-6422.
- Rizzuto G, Cappelletti M, Mennuni C *et al.* Gene electrotransfer results in a high-level transduction of rat skeletal muscle and corrects anemia of renal failure. *Hum.Gene Ther.* 2000; **11**: 1891-1900.
- Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA *et al.* Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J.Exp.Med.* 2005; **201**: 1397-1405.
- Rolland AP, Mumper RJ. Plasmid delivery to muscle: Recent advances in polymer delivery systems. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 1998; **30**: 151-172.

- Rols MP, Delteil C, Golzio M, Teissie J. Control by ATP and ADP of voltage-induced mammalian-cell-membrane permeabilization, gene transfer and resulting expression. *Eur.J.Biochem.* 1998; **254**: 382-388.
- Romero NB, Benveniste O, Payan C *et al.* Current protocol of a research phase I clinical trial of full-length dystrophin plasmid DNA in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Part II: clinical protocol. *Neuromuscul.Disord.* 2002; **12 Suppl 1**: S45-S48.
- Romero NB, Braun S, Benveniste O *et al.* Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum.Gene Ther.* 2004; **15**: 1065-1076.
- Rossi JJ. Ribozymes, genomics and therapeutics. *Chem.Biol.* 1999; **6**: R33-R37.
- Rubenstrunk A, Orsini C, Mahfoudi A, Scherman D. Transcriptional activation of the metallothionein I gene by electric pulses in vivo: basis for the development of a new gene switch system. *J.Gene Med.* 2003; **5**: 773-783.
- Rubenstrunk A, Mahfoudi A, Scherman D. Delivery of electric pulses for DNA electrotransfer to mouse muscle does not induce the expression of stress related genes. *Cell Biol.Toxicol.* 2004; **20**: 25-31.
- Rubenstrunk A, Trollet C, Orsini C, Scherman D. Positive in vivo heterologous gene regulation by electric pulses delivery with metallothionein I gene promoter. *J.Gene Med.* 2005; **7**: 1565-1572.
- Saito Y, Nonaka I. Initiation of satellite cell replication in bupivacaine-induced myonecrosis. *Acta Neuropathol.(Berl)* 1994; **88**: 252-257.
- Sakaguchi M, Koishihara Y, Tsuda H *et al.* The expression of functional erythropoietin receptors on an interleukin-3 dependent cell line. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1987; **146**: 7-12.
- Sakamoto M, Yuasa K, Yoshimura M *et al.* Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into mdx mice as a transgene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2002; **293**: 1265-1272.
- Salucci V, Scarito A, Aurisicchio L *et al.* Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system. *Gene Ther.* 2002; **9**: 1415-1421.

- Samakoglu S, Fattori E, Lamartina S *et al.* betaMinor-globin messenger RNA accumulation in reticulocytes governs improved erythropoiesis in beta thalassemic mice after erythropoietin complementary DNA electrotransfer in muscles. *Blood* 2001; **97**: 2213-2220.
- Sasaki R. Pleiotropic functions of erythropoietin. *Intern.Med.* 2003; **42**: 142-149.
- Satkauskas S, Bureau MF, Mahfoudi A, Mir LM. Slow accumulation of plasmid in muscle cells: supporting evidence for a mechanism of DNA uptake by receptor-mediated endocytosis. *Mol.Ther.* 2001; **4**: 317-323.
- Satkauskas S, Bureau MF, Puc M *et al.* Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis. *Mol.Ther.* 2002; **5**: 133-140.
- Schakman O, Gilson H, de C, V *et al.* Insulin-like growth factor-I gene transfer by electroporation prevents skeletal muscle atrophy in glucocorticoid-treated rats. *Endocrinology* 2005; **146**: 1789-1797.
- Schertzer JD, Plant DR, Lynch GS. Optimizing plasmid-based gene transfer for investigating skeletal muscle structure and function. *Mol.Ther.* 2006; **13**: 795-803.
- Scheuerbrandt G. 2003. Les approches de la recherche en vue d'un traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne. <http://www.duchenne-research.com/France.htm>. Review.
- Scheuerbrandt G. Report on a Round Table Conference in Monaco on 17th and 18th January, 2004. *Acta Myol.* 2004; **23**: 106-122.
- Schratzberger P, Krainin JG, Schratzberger G *et al.* Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle. *Mol.Ther.* 2002; **6**: 576-583.
- Serbest G, Horwitz J, Jost M, Barbee K. Mechanisms of cell death and neuroprotection by poloxamer 188 after mechanical trauma. *FASEB J.* 2006; **20**: 308-310.
- Serguera C, Bohl D, Rolland E, Prevost P, Heard JM. Control of erythropoietin secretion by doxycycline or mifepristone in mice bearing polymer-encapsulated engineered cells. *Hum.Gene Ther.* 1999; **10**: 375-383.
- Shaw JA, Delday MI, Hart AW, Docherty HM, Maltin CA, Docherty K. Secretion of bioactive human insulin following plasmid-mediated gene transfer to non-neuroendocrine cell lines, primary cultures and rat skeletal muscle in vivo. *J.Endocrinol.* 2002; **172**: 653-672.

- Shiotani A, O'Malley BW, Jr., Coleman ME, Flint PW. Human insulinlike growth factor 1 gene transfer into paralyzed rat larynx: single vs multiple injection. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 1999; **125**: 555-560.
- Shyu KG, Chang H, Wang BW, Kuan P. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *Am.J.Med.* 2003; **114**: 85-92.
- Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989; **244**: 1578-1580.
- Simovic D, Isner JM, Ropper AH, Pieczek A, Weinberg DH. Improvement in chronic ischemic neuropathy after intramuscular phVEGF165 gene transfer in patients with critical limb ischemia. *Arch.Neurol.* 2001; **58**: 761-768.
- Sriadibhatla S, Yang Z, Gebhart C, Alakhov VY, Kabanov A. Transcriptional activation of gene expression by pluronic block copolymers in stably and transiently transfected cells. *Mol Ther.* 2006 **13**:804-813.
- Stoll SM, Sclimenti CR, Baba EJ, Meuse L, Kay MA, Calos MP. Epstein-Barr virus/human vector provides high-level, long-term expression of alpha1-antitrypsin in mice. *Mol.Ther.* 2001; **4**: 122-129.
- Su LT, Gopal K, Wang Z *et al.* Uniform scale-independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector. *Circulation* 2005; **112**: 1780-1788.
- Suh J, Wirtz D, Hanes J. Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003; **100**: 3878-3882.
- Takahashi T, Ishida K, Itoh K *et al.* IGF-I gene transfer by electroporation promotes regeneration in a muscle injury model. *Gene Ther.* 2003; **10**: 612-620.
- Takeshita S, Isshiki T, Sato T. Increased expression of direct gene transfer into skeletal muscles observed after acute ischemic injury in rats. *Lab Invest* 1996a; **74**: 1061-1065.
- Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinahl T *et al.* Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest* 1996b; **75**: 487-501.
- Tanaka T, Ichimaru N, Takahara S *et al.* In vivo gene transfer of hepatocyte growth factor to skeletal muscle prevents changes in rat kidneys after 5/6 nephrectomy. *Am.J.Transplant.* 2002; **2**: 828-836.



- Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K *et al.* Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther.* 2002; **9**: 372-380.
- Tascou S, Sorensen TK, Glenat V *et al.* Stringent rosiglitazone-dependent gene switch in muscle cells without effect on myogenic differentiation. *Mol. Ther.* 2004; **9**: 637-649.
- Terada Y, Tanaka H, Okado T *et al.* Efficient and ligand-dependent regulated erythropoietin production by naked dna injection and in vivo electroporation. *Am.J.Kidney Dis.* 2001; **38**: S50-S53.
- Terada Y, Tanaka H, Okado T *et al.* Ligand-regulatable erythropoietin production by plasmid injection and in vivo electroporation. *Kidney Int.* 2002; **62**: 1966-1976.
- Thacker EL, Holtkamp DJ, Khan AS, Brown PA, Draghia-Akli R. Plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone efficacy in reducing disease associated with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Anim Sci.* 2006; **84**: 733-742.
- Thomas HE, Stunnenberg HG, Stewart AF. Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature* 1993; **362**: 471-475.
- Thule PM, Liu JM. Regulated hepatic insulin gene therapy of STZ-diabetic rats. *Gene Ther.* 2000; **7**: 1744-1752.
- Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997; **94**: 3352-3356.
- Tone CM, Cardoza DM, Carpenter RH, Draghia-Akli R. Long-term effects of plasmid-mediated growth hormone releasing hormone in dogs. *Cancer Gene Ther.* 2004; **11**: 389-396.
- Toumi H, F'guyer S, Best TM. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J.Anat.* 2006a; **208**: 459-470.
- Toumi H, Hegge J, Subbotin V *et al.* Rapid intravascular injection into limb skeletal muscle: a damage assessment study. *Mol. Ther.* 2006b; **13**: 229-236.
- Tremblay JP, Malouin F, Roy R *et al.* Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant.* 1993; **2**: 99-112.

- Tripathy SK, Svensson EC, Black HB *et al.* Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996; **93**: 10876-10880.
- Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D *et al.* Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996; **94**: 3281-3290.
- Turner PR, Fong PY, Denetclaw WF, Steinhardt RA. Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J.Cell Biol.* 1991; **115**: 1701-1712.
- Uhlenbeck OC, Pardi A, Feigon J. RNA structure comes of age. *Cell* 1997; **90**: 833-840.
- Umeda Y, Marui T, Matsuno Y *et al.* Skeletal muscle targeting in vivo electroporation-mediated HGF gene therapy of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Lab Invest* 2004; **84**: 836-844.
- Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; **97**: 7963-7968.
- Uyechi LS, Gagne L, Thurston G, Szoka FC, Jr. Mechanism of lipoplex gene delivery in mouse lung: binding and internalization of fluorescent lipid and DNA components. *Gene Ther.* 2001; **8**: 828-836.
- Valentine BA, Winand NJ, Pradhan D *et al.* Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. *Am.J.Med.Genet.* 1992; **42**: 352-356.
- van Deutekom JC, Hoffman EP, Huard J. Muscle maturation: implications for gene therapy. *Mol.Med.Today* 1998; **4**: 214-220.
- Varley AW, Geiszler SM, Gaynor RB, Munford RS. A two-component expression system that responds to inflammatory stimuli in vivo. *Nat.Biotechnol.* 1997; **15**: 1002-1006.
- Vercellotti GM, Hammerschmidt DE, Craddock PR, Jacob HS. Activation of plasma complement by perfluorocarbon artificial blood: probable mechanism of adverse pulmonary reactions in treated patients and rationale for corticosteroids prophylaxis. *Blood* 1982; **59**: 1299-1304.
- Vilaboa N, Fenna M, Munson J, Roberts SM, Voellmy R. Novel gene switches for targeted and timed expression of proteins of interest. *Mol.Ther.* 2005; **12**: 290-298.

- Vilalta A, Mahajan RK, Hartikka J *et al.* I. Poloxamer-formulated plasmid DNA-based human cytomegalovirus vaccine: evaluation of plasmid DNA biodistribution/persistence and integration. *Hum.Gene Ther.* 2005; **16**: 1143-1150.
- Vilquin JT, Kennel PF, Paturneau-Jouas M *et al.* Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther.* 2001; **8**: 1097-1107.
- Vilquin JT. Myoblast transplantation: clinical trials and perspectives. Mini-review. *Acta Myol.* 2005; **24**: 119-127.
- Vincent KA, Shyu KG, Luo Y *et al.* Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation* 2000; **102**: 2255-2261.
- Vitadello M, Schiaffino MV, Picard A, Scarpa M, Schiaffino S. Gene transfer in regenerating muscle. *Hum.Gene Ther.* 1994; **5**: 11-18.
- Wagner KR, Hamed S, Hadley DW *et al.* Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann.Neurol.* 2001; **49**: 706-711.
- Walker MC, Mandell TC, Crawford PC *et al.* Expression of erythropoietin in cats treated with a recombinant adeno-associated viral vector. *Am.J.Vet.Res.* 2005; **66**: 450-456.
- WALTON JN, NATTRASS FJ. On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain* 1954; **77**: 169-231.
- Wang LY, Sun W, Chen MZ, Wang X. Intramuscular injection of naked plasmid DNA encoding human preproinsulin gene in streptozotocin-diabetes mice results in a significant reduction of blood glucose level. *Sheng Li Xue.Bao.* 2003; **55**: 641-647.
- Wang M, Orsini C, Casanova D, Millan JL, Mahfoudi A, Thuillier V. MUSEAP, a novel reporter gene for the study of long-term gene expression in immunocompetent mice. *Gene* 2001; **279**: 99-108.
- Wang Y, O'Malley BW, Jr., Tsai SY, O'Malley BW. A regulatory system for use in gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994; **91**: 8180-8184.
- Wang Z, Troilo PJ, Wang X *et al.* Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther.* 2004; **11**: 711-721.
- Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J.Cell Biol.* 2001; **155**: 123-131.

- Wells DJ. Improved gene transfer by direct plasmid injection associated with regeneration in mouse skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1993; **332**: 179-182.
- Wells DJ, Wells KE, Asante EA *et al.* Expression of human full-length and minidystrophin in transgenic mdx mice: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Hum.Mol.Genet.* 1995; **4**: 1245-1250.
- Wells DJ, Maule J, McMahon J *et al.* Evaluation of plasmid DNA for in vivo gene therapy: factors affecting the number of transfected fibers. *J.Pharm.Sci.* 1998; **87**: 763-768.
- DJ. Wells. Viral and non-viral methods for gene transfer into skeletal muscle. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2006;**9**:163-168. Review.
- Werstuck G, Green MR. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science* 1998; **282**: 296-298.
- Wilson MO, Scougall KT, Ratanamart J, McIntyre EA, Shaw JA. Tetracycline-regulated secretion of human (pro)insulin following plasmid-mediated transfection of human muscle. *J.Mol.Endocrinol.* 2005; **34**: 391-403.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; **247**: 1465-1468.
- Wolff JA, Williams P, Acsadi G, Jiao S, Jani A, Chong W. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques* 1991; **11**: 474-485.
- Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum.Mol.Genet.* 1992; **1**: 363-369.
- Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv.Genet.* 2005; **54**: 3-20.
- Wong SH, Lowes KN, Quigley AF *et al.* DNA electroporation in vivo targets mature fibres in dystrophic mdx muscle. *Neuromuscul.Disord.* 2005; **15**: 630-641.
- Wu G, Majewski J, Ege C, Kjaer K, Weygand MJ, Lee KY. Interaction between lipid monolayers and poloxamer 188: an X-ray reflectivity and diffraction study. *Biophys.J.* 2005; **89**: 3159-3173.
- WYNGAARDEN JB, DUNN JT. 8-Hydroxyadenine as the intermediate in the oxidation of adenine to 2, 8-dihydroxyadenine by xanthine oxidase. *Arch.Biochem.Biophys.* 1957; **70**: 150-156.

- Xu L, Daly T, Gao C *et al.* CMV-beta-actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 alpha promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Hum. Gene Ther.* 2001; **12**: 563-573.
- Xu L, Zhao Y, Zhang Q, Li Y, Xu Y. Regulation of transgene expression in muscles by ultrasound-mediated hyperthermia. *Gene Ther.* 2004; **11**: 894-900.
- Xue F, Takahara T, Yata Y *et al.* Attenuated acute liver injury in mice by naked hepatocyte growth factor gene transfer into skeletal muscle with electroporation. *Gut* 2002; **50**: 558-562.
- Xue F, Takahara T, Yata Y *et al.* Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. *Gut* 2003; **52**: 694-700.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; **407**: 242-248.
- Z. Yang, J. Zhu, S. Sriadibhatla, C. Gebhart, V. Alakhov, A. Kabanov. Promoter-and strain-selective enhancement of gene expression in a mouse skeletal muscle by a polymer excipient Pluronic P85. *J Control Release.* 2005 ;**108**:496-512.
- Yasuda S, Townsend D, Michele DE, Favre EG, Day SM, Metzger JM. Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature* 2005; **436**: 1025-1029.
- Ye X, Rivera VM, Zoltick P *et al.* Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science* 1999; **283**: 88-91.
- Yew NS. Controlling the kinetics of transgene expression by plasmid design. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; **57**: 769-780.
- Yin D, Tang JG. Gene therapy for streptozotocin-induced diabetic mice by electroporation transfer of naked human insulin precursor DNA into skeletal muscle in vivo. *FEBS Lett.* 2001; **495**: 16-20.
- Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, Koizumi F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* 1986; **44**: 230-234.
- Zhang G, Ludtke JJ, Thioudellet C *et al.* Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 2004a; **15**: 770-782.

Zhang Q, Wang Z, Ran H *et al.* Enhanced gene delivery into skeletal muscles with ultrasound and microbubble techniques. *Acad.Radiol.* 2006; **13**: 363-367.

Zhang S, Xu Y, Wang B, Qiao W, Liu D, Li Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J.Control Release* 2004b; **100**: 165-180.

Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J.Virol.* 1999; **73**: 2886-2892.

## Publications

### Article 1 :

[Hum Gene Ther.](#) 2005 Nov;16(11):1318-24.

#### **Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles.**

- [Richard P](#), [Bossard F](#), [Desigaux L](#), [Lanctin C](#), [Bello-Roufai M](#), [Pitard B](#).

Institut du Thorax, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U533, Faculté de Médecine, 44000 Nantes, France.

We reported that amphiphilic block copolymers hold promise as nonviral vectors for the delivery of plasmid DNA, ranging from 4.7 to 6.2 kb, to healthy muscle for the production of local or secreted proteins. To evaluate the efficiency of these vectors to deliver large plasmid DNA molecules to pathological muscles, plasmid DNAs of various lengths were complexed with Lutrol or poloxamine 304 and injected intramuscularly into dystrophic muscles. Lutrol-DNA and poloxamine 304-DNA complexes promoted gene transfer into muscles of the naturally occurring mouse model for DMD (mdx) in a dose- and plasmid DNA size-dependent manner. For small plasmid DNAs encoding reporter genes, this improvement over naked DNA was smaller in mdx than in the wild-type control strain. By contrast, Lutrol enabled us to deliver the large plasmid (16.1 kb) encoding the rod-deleted dystrophin in mdx mouse muscle, whereas the same amount of naked DNA did not lead to dystrophin expression, under the same experimental conditions. Lutrol-treated mdx mice showed the production of dystrophin in large numbers of muscle fibers. More importantly, we also found that expressing dystrophin with Lutrol led to restoration of the dystrophin-associated protein complex. Thus, we conclude that block copolymers constitute a novel class of vectors for the delivery of large plasmid DNA not only to healthy muscles but also to pathological muscle tissues.

PMID: 16259565 [PubMed - indexed for MEDLINE]

**Article 2 :**

Therapy of anemia by plasmid EPO cDNA in kidney failure

Peggy Richard-Fiardo, Emmanuel Payen, Léa Desigaux, Julien Zuber, Raphaël Chèvre, Yves Beuzard, Bruno Pitard

Attente de soumission



**Article 3 :**

[J Gene Med.](#) 2005 Jan;7(1):80-6

**Inducible production of erythropoietin using intramuscular injection of block copolymer/DNA formulation.**

- [Richard P](#), [Pollard H](#), [Lanctin C](#), [Bello-Roufai M](#), [Desigaux L](#), [Escande D](#), [Pitard B](#).

L'Institut du Thorax, Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, Inserm U533, Faculte de Medecine, 44000 Nantes, France.

**BACKGROUND:** We have previously shown that intramuscular injection of plasmid DNA formulated with a non-ionic amphiphile synthetic vector [poly(ethylene oxide)(13)-poly(propylene oxide)(30)-poly(ethylene oxide)(13) block copolymer; PE6400] increases reporter gene expression compared with naked DNA. We have now investigated this simple non-viral formulation for production of secreted proteins from the mouse skeletal muscle. **METHODS:** Plasmids encoding either constitutive human secreted alkaline phosphatase or murine erythropoietin inducible via a Tet-on system were formulated with PE6400 and intramuscularly injected into the mouse tibial anterior muscle. **RESULTS:** PE6400/DNA formulation led to an increased amount of recombinant alkaline phosphatase secreted from skeletal muscle as compared with naked DNA. In the presence of doxycycline, a single injection of 10 microg plasmid encoding inducible murine erythropoietin formulated with PE6400 significantly increased the hematocrit, whereas the same amount of DNA in the absence of PE6400 had no effect. The increase in the hematocrit was stable for 42 days. The tetracycline-inducible promoter permitted pharmacological control of hematocrit level after DNA intramuscular injection. However, 4 months post-injection the hematocrit returned to its pre-injection value, even in the presence of doxycycline. This phenomenon was likely caused by an immune response against the tetracycline-activated transcription factor. **CONCLUSIONS:** Intramuscular injection of plasmid DNA formulated with PE6400 provides an efficient and simple method for secretion and production of non-muscle proteins.

PMID: 15468192 [PubMed - indexed for MEDLINE]

## Autres articles

[Nucleic Acids Res.](#) 2004 Nov 16;32(20):e159.

### **Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer.**

- [Pitard B](#), [Bello-Roufai M](#), [Lambert O](#), [Richard P](#), [Desigaux L](#), [Fernandes S](#), [Lanctin C](#), [Pollard H](#), [Zeghal M](#), [Rescan PY](#), [Escande D](#).

L'institut du Thorax, Inserm U533, Faculte de Medecine, 44035 Nantes, France.  
bruno.pitard@nantes.inserm.fr

Over the past decade, numerous nonviral cationic vectors have been synthesized. They share a high density of positive charges and efficiency for gene transfer in vitro. However, their positively charged surface causes instability in body fluids and cytotoxicity, thereby limiting their efficacy in vivo. Therefore, there is a need for developing alternative molecular structures. We have examined tetrabranched amphiphilic block copolymers consisting of four polyethyleneoxide/polypropyleneoxide blocks centered on an ethylenediamine moiety. Cryo-electron microscopy, ethidium bromide fluorescence and light and X-ray scattering experiments performed on vector-DNA complexes showed that the dense core of the nanosphere consisted of condensed DNA interacting with poloxamine molecules through electrostatic, hydrogen bonding and hydrophobic interactions, with DNA molecules also being exposed at the surface. The supramolecular organization of block copolymer/DNA nanospheres induced the formation of negatively charged particles. These particles were stable in a solution that had a physiological ionic composition and were resistant to decomplexation by heparin. The new nanostructured material, the structure of which clearly contrasted with that of lipoplexes and polyplexes, efficiently transferred reporter and therapeutic genes in skeletal and heart muscle in vivo. Negatively charged supramolecular assemblies hold promise as therapeutic gene carriers for skeletal and heart muscle-related diseases and expression of therapeutic proteins for local or systemic uses.

PMID: 15547248 [PubMed - indexed for MEDLINE]

[Hum Gene Ther.](#) 2005 Jul;16(7):821-9.

## **Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung.**

- [Desigaux L](#), [Gourden C](#), [Bello-Roufai M](#), [Richard P](#), [Oudrhiri N](#), [Lehn P](#), [Escande D](#), [Pollard H](#), [Pitard B](#).

Institut du Thorax, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U533, Faculté de Médecine, 44035 Nantes, France.

Various pulmonary disorders, including cystic fibrosis, are potentially amenable to a treatment modality in which a therapeutic gene is directly delivered to the lung. Current gene delivery systems, either viral or nonviral, need further improvement in terms of efficiency and safety. We reported that nonionic amphiphilic block copolymers hold promise as nonviral gene delivery systems for transfection of muscular tissues. To evaluate the efficiency of these vectors in the lung, intratracheal instillation or aerosolization of reporter genes complexed with Lutrol or PE6400 was performed. Lutrol-DNA and, to a lesser extent, PE6400-DNA complexes promoted efficient gene transfection into mouse airways in a dose-dependent manner. This improvement over naked DNA was observed irrespective of the reporter gene. Lutrol enabled us to deliver significantly higher DNA amounts than current nonviral vectors, with even greater increases in gene expression and without the formation of colloiddally unstable complexes. Time course studies showed that Lutrol-DNA complexes permitted prolonged gene expression for up to 5 days whereas with poly(ethylenimine) (PEI)-DNA polyplexes, expression peaked on days 1-2 postinstillation, was strongly reduced by day 5, and reached background levels on day 7. Aerosolized delivery of Lutrol-DNA complexes, a less invasive approach to deliver genes to the lung, gave 5- to 15-fold higher reporter gene expression compared with PEI-DNA polyplexes administered via the same delivery route. After intratracheal instillation of Lutrol-DNA complexes, histochemical staining for beta-galactosidase expression showed the presence of large blue areas. Histopathological analysis showed that Lutrol alone did not elicit inflammation, and that the inflammatory response after intratracheal instillation of Lutrol-DNA complexes was reversible and was observed only with the highest amounts of DNA. We also found that Lutrol can efficiently deliver genes to the airways of cystic fibrosis mice. Thus, we conclude that Lutrol is a highly promising vector for gene delivery to the lung.

PMID: 16000064 [PubMed - indexed for MEDLINE]

## RÉSUMÉ :

Le transfert de gènes dans le muscle squelettique à l'aide de vecteurs synthétiques représente une stratégie prometteuse pour le traitement de maladies génétiques héréditaires ou acquises. Parmi les vecteurs synthétiques utilisés pour le transfert de gènes dans cet organe, les copolymères à blocs présentent de nombreux avantages en terme d'efficacité et de toxicité. Ces vecteurs se sont révélés être très efficaces pour permettre l'expression de la dystrophine et la restauration du complexe dystroglycoprotéique membranaire chez la souris myopathe. Le muscle squelettique peut également être utilisé comme organe sécréteur de protéines thérapeutiques systémiques. Le transfert du gène de l'érythropoïétine à l'aide de copolymères à blocs a permis la correction de l'anémie chez un modèle de souris en insuffisance rénale chronique. L'utilisation d'un promoteur inductible par la doxycycline permet de réguler l'expression du gène de l'érythropoïétine jusqu'à 4 mois après le transfert de gène avant la mise en place d'une réaction immunitaire contre le transactivateur chimérique. La répétition d'injections intramusculaires du gène codant l'érythropoïétine formulé avec des copolymères à blocs, permet d'adapter durablement le niveau de sécrétion d'érythropoïétine

RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS

There is conclusive evidence that muscle gene therapy using synthetic vectors can lead to real clinical benefit for treatment of genetic or acquired diseases. Block copolymers are new efficient and non toxic vectors used for gene transfer in this organ. These vectors have been used to restore efficiently the expression of dystrophin and led to the restoration of the dystrophin proteins complex in dystrophic mice. This approach using new synthetic vectors is particularly appropriate to obtain long-term circulating therapeutic protein. Intramuscular injections of a plasmid DNA encoding this protein formulated with block copolymer prevent or correct anemia induced by acquired renal failure in adenine treated mice. The temporal regulation of erythropoietin gene expression was obtained by the use of a tetracyclin inducible promoter. However, an immune response against the chimeric transactivator was observed 4 months post-injection stopping the EPO synthesis. The development of a protocol consisting in repeated intramuscular injections of block copolymer/DNA formulations provides an efficient method for a durable and an adjustable secretion of erythropoietin.

TITRE DE LA THESE EN ANGLAIS

Block copolymers for skeletal muscle gene transfer.