HAL
open science

Thérapie génique non virale de variants du gène du récepteur soluble de type I du TNF-alpha humain. Application à différents modèles de pathologies inflammatoires

Carole Bloquel

To cite this version:

Carole Bloquel. Thérapie génique non virale de variants du gène du récepteur soluble de type I du TNF-alpha humain. Application à différents modèles de pathologies inflammatoires. Life Sciences [q-bio]. Chimie ParisTech, 2005. English. NNT : . pastel-00001807

HAL Id: pastel-00001807

https://pastel.hal.science/pastel-00001807v1

Submitted on 3 Jul 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS 7 – DENIS DIDEROT
UFR Lariboisière Saint Louis
Ecole doctorale : Biologie et Biotechnologie

Année 2005

THESE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 7

Spécialité : Biologie de l'os et des articulations et biomatériaux des tissus calcifiés

---

Thérapie génique non virale de variants du gène du récepteur soluble de type I du TNF-α humain

Application à différents modèles de pathologies inflammatoires

---

Présentée par

Carole BLOQUEL

Soutenue publiquement le 7 juin 2005

Jury

M. Marie-Christophe Boissier	Président
Mme Marie-Pierre Rols	Rapporteur
M. Didier Fradelizi	Rapporteur
M. Yves Beuzard	Examinateur
Mlle Natacha Bessis	Directeur de thèse
M. Daniel Scherman	Directeur de thèse

A mes parents, pour leur soutien tout au long de mon parcours

A ma famille, à mes neveux,

A Vincent,

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien, la disponibilité et les compétences de nombreuses personnes, que je souhaite remercier ici.

Je tiens tout d'abord à remercier *Daniel Scherman* pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire… il y a cinq ans déjà pour mon premier stage! Merci pour m'avoir accordé votre confiance, pour vos conseils avisés, et pour avoir toujours su orienter mon projet dans des directions innovantes et passionnantes.

Un énorme merci à *Natacha Bessis*, pour avoir co-encadré ce travail avec tant d'énergie et de patience. Je te remercie pour ton soutien, ta disponibilité, pour toutes nos discussions, scientifiques ou moins, pour ton enthousiasme et ta volonté de mener à bien nos projets.

Je remercie *Marie-pierre Rols* et *Didier Fradelizi* pour avoir accepté de juger ces travaux et d'être rapporteur de cette thèse.

Je suis très reconnaissante à *Yves Beuzard* qui me fait l'honneur d'examiner ce travail.

Un sincère merci à *Marie-Christophe Boissier* qui m'a accueilli dans son laboratoire pour me faire découvrir l'immunologie et m'enrichir de son expérience de clinicien. Merci aussi d'avoir accepté d'être président de ce jury.

Merci à *Pacal Bigey* pour ses précieux conseils, et la grande liberté de mouvements et d'initiative qu'il a su m'accorder tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai eu l'immense joie de collaborer, avec plus ou moins de succès… Merci à *Francine Behar-Cohen* et son équipe de l'INSERM U598, *Catherine Marchand-Leroux* et *Michel Plotkine* de l'UPRES EA2510, *Florence Apparailly* de l'INSERM U475, *Antonino Nicoletti* de l'INSERM U430, *Ziad Mallat* et *Alain Tedgui* de l'INSERM U541, pour tous les échanges, si enrichissants, que nous avons eu.

Je remercie chaleureusement *Michel Bureau* pour sa gentillesse, sa patience, toutes nos discussions, parfois animées, mais toujours enrichissantes et constructives.

Un grand merci aux équipes de "mes deux laboratoires d'accueil".
En particulier, merci à *Delphine Lemeiter* pour sa précieuse aide au quotidien, sa patience pour les cellules, et pour avoir si parfaitement assuré la liaison "à distance". Merci aussi à *Johanne Seguin* et *Stéphane Chambris*, toujours disponibles pour m'aider à m'occuper des p'tites bêtes. Merci à *Fethi Bedioui* pour ses ingénieuses conceptions d'électrodes.

Merci à *Aline Savarin*, ma co-thésarde, pour les bons et les moins bons moments partagés au labo, et ailleurs (je t'attends sérieusement pour le prochain concert de Bénabar!).

Je ne saurai oublier les collègues passés (*Farida*, *Mada*) et présents : *Gaëlle Vandermeulen* (et l'heure sacrée du déjeuner!), *Magali Richard*, *Corinne Marie*, *Gaëlle Clavel* (et sa précision d'injection intra-articulaire), *Anne Denys*, *Olivier Jaen*, *Aurore Miellot*, et tous les autres……. Merci pour m'avoir offert une ambiance de travail (et de détente aussi!) si agréable.

Merci enfin à toute l'équipe administrative : *Kris*, *Segar* (et sa p'tite visite quotidienne) et *Evelyne*.

SOMMAIRES

ABREVIATIONS……- 15 -

INTRODUCTION……- 21 -

I. Le TNF-α ……- 23 -
II. Rôle du TNF-α dans différents types de pathologies……- 33 -
III. Thérapies protéiques et chimiques anti-TNF-α……- 51 -
IV. La thérapie génique ……- 59 -

OBJECTIFS……- 73 -

MATERIEL ET METHODES……- 77 -

I. Plasmides et biologie moléculaire ……- 79 -
II. Préparation des animaux……- 84 -
III. Électrotransfert *in vivo* ……- 84 -
IV. Transfert de gène par cellules autologues ……- 86 -
V. Prélèvements et préparation des échantillons……- 87 -
VI. Dosages et mesure d'activité biologique ……- 88 -
VII. Imagerie optique du petit animal ……- 91 -
VIII. Modèle d'inflammation aiguë induite par le LPS……- 92 -
IX. Modèle de traumatisme crânien ……- 93 -
X. Uvéite expérimentale aux endotoxines ……- 94 -
XI. Arthrite expérimentale au collagène……- 95 -
XII. Localisation sur coupes histologiques des cellules transfectées par électrotransfert intra-oculaire ……- 95 -
XIII. Statistiques……- 96 -

RESULTATS……- 97 -

I. Construction et validation des variants du hTNFR-Is……- 99 -
I.1. Clonage et validation in vitro……- 99 -
I.2. Activité biologique des récepteurs solubles après électrotransfert intramusculaire……- 100 -
II. Validation des méthodes d'électrotransfert et caractéristiques d'expression obtenues ……- 105 -
II.1. Electrotransfert intramusculaire……- 105 -
II.2. Electrotransfert intra-articulaire……- 110 -
II.3. Electrotransfert intra-oculaire……- 120 -
III. Potentialité thérapeutique des variants par électrotransfert……- 123 -
III.1. Traumatisme cérébral……- 123 -
III.2. Uvéite expérimentale aux endotoxines……- 131 -
III.3. Arthrite expérimentale au collagène : approche systémique ……- 136 -
IV. Transfert de gène par cellules autologues ……- 141 -
IV.1. Validation de l'approche par thérapie génique cellulaire ……- 141 -
IV.2. Caractéristiques d'expression de la lignée autologue ……- 141 -

DISCUSSION……- 147 -

I. Stratégies de thérapie génique anti-TNF ……- 149 -
II. Comparaison des variants du hTNFR-Is……- 161 -
III. Potentialité thérapeutique des variants du hTNFR-Is étudiés……- 167 -

CONCLUSION……- 175 -

BIBLIOGRAPHIE……- 179 -

PUBLICATIONS……- 199 -

ANNEXE : RESUME DES RESULTATS

ABREVIATIONS……..……..- 15 -

INTRODUCTION……..……..- 21 -

I. Le TNF-α ..... - 23 -

I.1. Présentation du TNF-α ..... - 23 -
I.1.1 *Historique du TNF-α* ..... - 23 -
I.1.2 *La superfamille du TNF* ..... - 23 -
I.1.3 *Gène et protéine* ..... - 23 -
I.1.4 *Production de TNF-α* ..... - 24 -
I.1.5 *Régulation de la synthèse du TNF-α* ..... - 25 -
I.2. Les récepteurs du TNF-α ..... - 26 -
I.2.1 *Présentation* ..... - 26 -
I.2.2 *Liaison avec le TNF-α* ..... - 27 -
I.2.3 *Voies de signalisation intracellulaire* ..... - 28 -
I.2.4 *Récepteurs solubles* ..... - 29 -
I.3. Activités biologiques du TNF-α ..... - 30 -
I.3.1 *Les cellules cibles du TNF-α* ..... - 30 -
I.3.2 *Les actions cellulaires du TNF-α* ..... - 31 -

II. Rôle du TNF-α dans différents types de pathologies ..... - 33 -

II.1. Inflammation aiguë : le choc septique ..... - 33 -
II.1.1 *Présentation* ..... - 33 -
II.1.2 *Déroulement de l'inflammation au cours du choc septique* ..... - 33 -
II.1.3 *Rôle majeur des cytokines* ..... - 34 -
II.1.4 *Approches thérapeutiques* ..... - 35 -
II.2. Le traumatisme crânien ..... - 35 -
II.2.1 *Présentation* ..... - 35 -
II.2.2 *Inflammation cérébrale post-traumatique* ..... - 36 -
II.2.3 *Modes d'action actuels* ..... - 38 -
II.2.4 *Modèles expérimentaux* ..... - 38 -
II.3. Inflammation aiguë ou chronique : l'uvéite ..... - 39 -
II.3.1 *Présentation* ..... - 39 -
II.3.2 *Inflammation intra-oculaire* ..... - 40 -
II.3.3 *Rôle majeur du TNF-α* ..... - 41 -
II.3.4 *Traitements actuels* ..... - 42 -
II.3.5 *Modèles expérimentaux* ..... - 42 -
II.4. Maladie auto-immune : la polyarthrite rhumatoïde ..... - 43 -
II.4.1 *Présentation* ..... - 43 -
II.4.2 *Déroulement de la maladie*[26,136] ..... - 44 -
II.4.3 *Importance des cytokines* ..... - 46 -
II.4.4 *Rôle fondamental du TNF-α* ..... - 47 -
II.4.5 *Traitements actuels* ..... - 47 -
II.4.6 *Modèles expérimentaux* ..... - 48 -
II.4.7 *Arthrite expérimentale au collagène* ..... - 48 -

III. Thérapies protéiques et chimiques anti-TNF-α ..... - 51 -

III.1. Inhibiteurs de la signalisation régulant la synthèse de TNF-α ..... - 51 -
III.1.1 *Voie des MAPK :* ..... - 51 -
III.1.2 *Voie NF-κB :* ..... - 51 -
III.1.3 *Inhibiteurs de la transcription par modification de la concentration cellulaire en AMPc* ..... - 52 -
III.2. Régulateurs des mécanismes post-transcriptionnels de l'ARN du TNF-α ..... - 52 -
III.2.1 *Régulation des protéines AUBP* ..... - 52 -
III.2.2 *Action sur la région 3' non transcrite de l'ARNm du TNF-α* ..... - 52 -
III.2.3 *Thalidomide* ..... - 52 -
III.3. Inhibiteurs de la libération membranaire du TNF-α ..... - 53 -
III.4. Modulateurs de l'activité biologique du TNF-α : anticorps, récepteurs solubles et dérivés ..... - 53 -
III.4.1 *Les anticorps anti-TNF-α* ..... - 54 -
III.4.2 *Les récepteurs solubles* ..... - 55 -
III.4.3 *Etude du mécanisme d'action des anti-TNF-α* ..... - 56 -

III.5. Inhibiteurs de la transduction cellulaire induite par liaison du TNF-α à ses récepteurs ..... - 57 -
III.6. Autres perspectives thérapeutiques anti-TNF-α ..... - 58 -
III.6.1 *Cytokines anti-TNF-α* ..... - 58 -
III.6.2 *Vaccination anti-TNF-α* ..... - 58 -

IV. La thérapie génique ..... - 59 -

IV.1. Approche thérapeutique ..... - 59 -
IV.2. Les outils de thérapie génique ..... - 60 -
IV.2.1 *La cellule cible* ..... - 60 -
IV.2.2 *Le gène d'intérêt* ..... - 60 -
IV.2.3 *Le système de transfert de gène : les vecteurs* ..... - 61 -
IV.2.4 *L'électrotransfert* ..... - 67 -

OBJECTIFS ..... - 73 -

MATERIEL ET METHODES ..... - 77 -

I. Plasmides et biologie moléculaire ..... - 79 -

I.1. Plasmides ..... - 79 -
I.1.1 *pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2, pCOR Vide* ..... - 79 -
I.1.2 *pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2, pVAX2* ..... - 80 -
I.1.3 *pVAX2 luc* ..... - 81 -
I.1.4 *pEGFP-C1* ..... - 81 -
I.1.5 *pCDNA3.1 hygromycine* ..... - 81 -
I.1.6 *Préparation des solutions d'ADN plasmidique* ..... - 81 -
I.2. Extraction d'acides nucléiques ..... - 82 -
I.2.1 *Extraction des ARN totaux* ..... - 82 -
I.2.2 *Extraction d'ADN génomique* ..... - 82 -
I.3. RT et PCR ..... - 82 -
I.3.1 *Reverse transcription des ARNm-Amplifcation par PCR* ..... - 82 -
I.3.2 *Etude de dissémination du vecteur électrotransféré i.m par PCR* ..... - 84 -

II. Préparation des animaux ..... - 84 -

II.1. Souris ..... - 84 -
II.2. Rats ..... - 84 -

III. Électrotransfert *in vivo* ..... - 84 -

III.1. Electrotransfert intramusculaire ..... - 84 -
III.2. Electrotransfert intra-articulaire ..... - 85 -
III.3. Electrotransfert intra-oculaire, dans le muscle ciliaire ..... - 85 -

IV. Transfert de gène par cellules autologues ..... - 86 -

IV.1. Culture cellulaire ..... - 86 -
IV.2. Transfection transitoire ..... - 86 -
IV.3. Etablissement de la lignée stable DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 ..... - 86 -
IV.4. Injection de cellules autologues ..... - 86 -

V. Prélèvements et préparation des échantillons ..... - 87 -

V.1. Prélèvement de sang ..... - 87 -
V.2. Prélèvement de muscle ..... - 87 -
V.3. Prélèvement de peau ..... - 87 -
V.4. Prélèvement du genou ..... - 87 -
V.5. Prélèvement des yeux ..... - 87 -
V.6. Prélèvement de cerveau ..... - 88 -
V.7. Récupération de lymphocytes activés dans la rate ..... - 88 -
V.7.1 *Stimulation immune* ..... - 88 -
V.7.2 *Récupération des lymphocytes* ..... - 88 -

VI. Dosages et mesure d'activité biologique ..... - 88 -

VI.1. Dosage par ELISA du hTNFR-Is, mTNF-α, mIL-1β et rTNF-α ..... - 88 -
VI.2. Evaluation de l'activité biologique du hTNFR-Is ..... - 89 -
VI.2.1 *Cellules L929* ..... - 89 -
VI.2.2 *Evaluation in vitro* ..... - 89 -

VI.2.3 *Evaluation ex vivo* ..... - 89 -
VI.2.4 *Dosage MTT* ..... - 90 -
VI.3. Dosage par ELISA des anticorps anti-hTNFR-Is ..... - 90 -
VI.4. Dosage de l'activité luciférase ..... - 90 -
VI.5. Dosage par ELISA des anticorps anti-luciférase ..... - 91 -
VI.6. Détermination de l'activité myéloperoxidase (MPO) pulmonaire ..... - 91 -

VII. Imagerie optique du petit animal ..... - 91 -

VII.1. Dispositif et réalisation des acquisitions ..... - 91 -
VII.2. Analyse des données ..... - 92 -

VIII. Modèle d'inflammation aiguë induite par le LPS ..... - 92 -

VIII.1. Procédure expérimentale générale ..... - 92 -
VIII.2. Prétraitement par électrotransfert i.m ..... - 92 -
VIII.3. Induction de l'inflammation aiguë ..... - 92 -

IX. Modèle de traumatisme crânien ..... - 93 -

IX.1. Procédure expérimentale générale ..... - 93 -
IX.2. Evaluation du déficit neurologique ..... - 93 -
IX.3. Evaluation de l'œdème cérébral : mesure du contenu en eau ..... - 93 -

X. Uvéite expérimentale aux endotoxines ..... - 94 -

X.1. Procédure générale ..... - 94 -
X.2. Prétraitement par électrotransfert ..... - 94 -
X.3. Induction de la maladie ..... - 94 -
X.4. Evaluation de l'uvéite ..... - 94 -
X.4.1 *Signes cliniques* ..... - 94 -
X.4.2 *Signes histologiques* ..... - 94 -

XI. Arthrite expérimentale au collagène ..... - 95 -

XI.1. Induction de la maladie ..... - 95 -
XI.2. Evaluation des arthrites ..... - 95 -
XI.2.1 *Signes articulaires cliniques* ..... - 95 -
XI.2.2 *Atteintes histologiques au sacrifice* ..... - 95 -

XII. Localisation sur coupes histologiques des cellules transfectées par électrotransfert intra-oculaire ..... - 95 -

XIII. Statistiques ..... - 96 -

RESULTATS ..... - 97 -

I. Construction et validation des variants du hTNFR-Is ..... - 99 -

I.1. Clonage et validation in vitro ..... - 99 -
I.1.1 *Clonage et expression de hTNFR-Is* ..... - 99 -
I.1.2 *Activité biologique des variants du hTNFR-Is* ..... - 99 -
I.2. Activité biologique des récepteurs solubles après électrotransfert intramusculaire ..... - 100 -
I.2.1 *Test d'activité sur cellules L929* ..... - 100 -
I.2.2 *Validation de l'activité biologique des hTNFR-Is sur un modèle in vivo d'inflammation au LPS* ..... - 101 -

II. Validation des méthodes d'électrotransfert et caractéristiques d'expression obtenues ..... - 105 -

II.1. Electrotransfert intramusculaire ..... - 105 -
II.1.1 *Effet dose* ..... - 105 -
II.1.2 *Etude cinétique* ..... - 107 -
II.1.3 *Dissémination du vecteur* ..... - 109 -
II.1.4 *Evaluation des anticorps anti-hTNFR-Is* ..... - 109 -
II.2. Electrotransfert intra-articulaire ..... - 110 -
II.2.1 *Validation de la méthode* ..... - 110 -
II.2.2 *Localisation de l'expression par imagerie optique* ..... - 111 -
II.2.3 *Effet dose en hTNFR-Is* ..... - 112 -
II.2.4 *Etude cinétique* ..... - 115 -
II.2.5 *Etude de la réponse immune* ..... - 118 -
II.3. Electrotransfert intra-oculaire ..... - 120 -
II.3.1 *Efficacité de la méthode et localisation de l'expression du transgène* ..... - 120 -
II.3.2 *Etude cinétique* ..... - 121 -

II.3.3 *Expression de hTNFR-Is* ..... - 122 -

III. Potentialité thérapeutique des variants par électrotransfert ..... - 123 -

III.1. Traumatisme cérébral ..... - 123 -
III.1.1 *Cinétique de production du TNF-α* ..... - 123 -
III.1.2 *Modèle de traumatisme cérébral diffus* ..... - 124 -
III.1.3 *Etude des trois variants du hTNFR-Is* ..... - 124 -
III.1.4 *Etude approfondie de la forme chimérique hTNFR-Is/mIgG1* ..... - 127 -
III.2. Uvéite expérimentale aux endotoxines ..... - 131 -
III.2.1 *Electrotransfert de 30 µg de plasmide codant la forme chimérique* ..... - 131 -
III.2.2 *Electrotransfert de 3 µg de plasmide codant la forme chimérique* ..... - 133 -
III.3. Arthrite expérimentale au collagène : approche systémique ..... - 136 -
III.3.1 *Electrotransfert de 15 µg de plasmide codant les variants du hTNFR-Is* ..... - 136 -
III.3.2 *Electrotransfert de 50 µg de plasmide codant les variants du hTNFR-Is* ..... - 137 -

IV. Transfert de gène par cellules autologues ..... - 141 -

IV.1. Validation de l'approche par thérapie génique cellulaire ..... - 141 -
IV.1.1 *Expression de hTNFR-Is par les cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 in vitro* ..... - 141 -
IV.1.2 *Activité biologique du hTNFR-Is produit par les cellules de la lignée stable* ..... - 141 -
IV.2. Caractéristiques d'expression de la lignée autologue ..... - 141 -
IV.2.1 *Etude cinétique* ..... - 142 -
IV.2.2 *Expression du transgène après une seconde administration de cellules autologues* ..... - 143 -
IV.2.3 *Evaluation des anticorps anti hTNFR-Is* ..... - 145 -

DISCUSSION ..... - 147 -

I. Stratégies de thérapie génique anti-TNF ..... - 149 -

I.1. Stratégies systémiques ..... - 150 -
I.1.1 *Electrotransfert intramusculaire* ..... - 150 -
I.1.2 *Thérapie génique cellulaire* ..... - 152 -
I.2. Stratégies locales ..... - 154 -
I.2.1 *Electrotransfert intra-articulaire* ..... - 154 -
I.2.2 *Electrotransfert intra-oculaire* ..... - 157 -

II. Comparaison des variants du hTNFR-Is ..... - 161 -

II.1. Activité biologique ..... - 161 -
II.2. Expression après électrotransfert intramusculaire ..... - 162 -
II.3. Expression après électrotransfert intra-articulaire ..... - 163 -

III. Potentialité thérapeutique des variants du hTNFR-Is étudiés ..... - 167 -

III.1. Modèle de traumatisme cérébral ..... - 167 -
III.2. Modèle d'uvéite expérimentale aux endotoxines ..... - 170 -
III.3. Modèle d'arthrite expérimentale au collagène ..... - 171 -
III.3.1 *Approches systémiques* ..... - 171 -
III.3.2 *Approche locale* ..... - 173 -

CONCLUSION ..... - 175 -

BIBLIOGRAPHIE ..... - 179 -

PUBLICATIONS ..... - 199 –

ANNEXE : RESUME DES RESULTATS

ABREVIATIONS

AAV	Virus Associé à l'Adénovirus
ACF	Adjuvant Complet de Freund
ADCC	cytotoxicité dépendante de l'anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AEC	Arthrite Expérimentale au Collagène
AIF	Adjuvant Incomplet de Freund
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
AMPc	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
AP-1	Activator Protein 1
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ATP	adénosine triphosphate
AUBP	AURE Binding-Protein
AUF1	A+U-Rich Element Binding Factor 1
AURE	Adenosine-Uridine Rich Element
BDCF	Brain-Derived Chemotactic Factor
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
bp	paire de bases
BRE	brain-reproductive
BSA	Albumine de Sérum Bovin
CCD	Cooled Charged Device
CDC	Cytotoxicité Dépendante du Complément
CDR	Domaine Riche en Cystéine
CHO	cellules d'ovaire de hamster chinois
cIAP	inhibiteurs de l'apoptose cellulaire
CIDs	selective cytokine inhibitory drugs
CII	Collagène de type II
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CO2	dioxyde de carbone
COS	cellules de rein de singe
COX	cyclo-oxygenase
CPA	Cellule Présentatrice de l'Antigène
CRE	Cyclic adenosine monophosphate Response Element
CRP	C Reactive Protein
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
DAPI	4',6-diamino-2-phénylindole
DD	domaine de mort (Death Domain)
DOGS	acide 4-trifluoroacétique dioctadécylamidoglycylspermine
DOPE	dioléoylphosphatidyl éthanolamine
DOSPA	2,3-dioléyloxy-N-[2(sperminecarboxyamido)éthyl]-N,N'-diméthyl-1-propanaminium trifluroacétate
DOTAP	1,2-dioléoyloxypropyl-3-(triméthylammonium)propane
DOTMA	chlorure de N-[1-(2,3-dioléyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium
EBV	Virus d'Epstein Barr
EDTA	acide éthylènediamine-tétra-acétique
EIU	uvéite expérimentale aux endotoxines
ELISA	Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay
Epo	érythropoïétine

FADD	Fas Associated Death Domain
FAS	membre de la superfamille des récepteurs du TNF
FASL	FAS Ligand
Fc	Fragment constant
FcγR	Récepteur de type γ du Fc des immunoglobulines
GCS	échelle de coma de Glasgow
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	facteur stimulant les granulocytes-macrophages
GMPc	Guanosine Mono-Phosphate cyclique
HEL-N1	human ELAV-like neuronal protein 1 (embryonic lethal abnormal vision)
HLA	Antigène des Leucocytes Humains
hTNFRs	Récepteur soluble du TNF-α humain
HuR	ou ELAV-like protein 2 (embryonic lethal abnormal vision)
HV	High Voltage
IκB	inhibiteur de NF-κB
i.m	intramusculaire
i.p	intrapéritonéal
i.v	intraveineux
ICAD	inhibiteurs des DNases activées par les caspases
ICAM	molécule d'adhésion intracellulaire
IFN	interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IL-1Ra	antagoniste du Récepteur de l'IL-1
IMID	immunomodulatory drugs
iNOS	NOS inductible
IRBP	Interphotoreceptor Retinoid-Binbing Protein
JNK	c Jun N-terminal kinase
kb	kilo bases
kD	kilo Dalton
LB	Lymphocyte B
LBP	LPS Binding Protein
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LV	Low Voltage
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
M-CSF	facteur stimulant les macrophages
MK	Map Kinase
MLV	Murine Leukemia Virus
MMP	métalloprotéase matricielle
MMT	sel de tétrazolium
MPO	myéloperoxydase
NF-κB	Nuclear Factor κB
NF-AT	Nuclear Factor of Activated T cell
NGF	Nerve Growth Factor
NK	cellule Natural Killer
NO•	monoxyde d'azote
NOD	Diabétique Non Obèse

NOS	NO synthase
OPG	ostéoprotégérine
PAF	Platelet Activating Factor
pCOR	plasmid with Conditional Origin of Replication
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEA	endotoxine A de *Pseudonomas aeruginosa*
PEG	polyéthylène glycol
PEI	polyéthylène-imine
PGE2	prostaglandine E2
PGI2	prostacycline
PIC	pression intracrânienne
PLAD	Pre-Ligand Assembly Domain
PN	polynucléaire
PNN	polynucléaire neutrophile
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
PSII	inflammation intra-oculaire du segment postérieur
RANKL	Ligand de RANK (receptor activator of NF-κB)
RIP	Receptor Interacting Protein
RT	Reverse Transcription
RX	Rayons X
s.c	sous-cutané
SCID	Déficit Immunitaire Combiné Sévère
SODD	Silencer Of Death Domain
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TACE	TNF Convertase Enzyme
TCR	Récepteur des Lymphocytes T
TGF	Tumor Growth Factor
Th	lymphocyte T helper
THD	Domaine Homologue au TNF
Thr	thrombine
TIA-1	type de AUBP (T-cell intracellular antigen)
TIAR	type de AUBP
TIMP	Tissue Inhibition of MMP
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor (facteur de nécrose des tumeurs)
TNFR	Récepteur du TNF-α
TNFRs	Récepteur soluble du TNF-α
TRADD	TNFR Associated Death Domain
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TTP	tristetrapolin
UAE	Uvéite Auto-immune Expérimentale
UV	UltraViolet
VACM	Molécule d'Adhésion des Cellules Vasculaires
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

I. Le TNF-α

I.1. Présentation du TNF-α

I.1.1 *Historique du TNF-α*

L'histoire du TNF débute il y a plus d'un siècle, en 1868, lorsque le physicien allemand P. Brunes met en évidence la régression spontanée de tumeurs chez des patients suite à une infection bactérienne aiguë, la tuberculose. En 1944, un des inducteurs principaux du TNF, l'endotoxine, un polysaccharide bactérien, est isolé des bactéries gram-négatives par Murray Shear. Ce polysaccharide induit la nécrose hémorragique des tumeurs. Par la suite, en 1962, O'Malley rapporte la production d'un facteur sérique chez les souris normales stimulées par l'endotoxine, le sérum de ces même animaux pouvant induire la nécrose lorsqu'il est administré à des animaux porteurs de tumeurs ; il a été nommé tumor necrosis sérum (TNS), puis renommé en 1975 tumor necrosis factor (TNF)[1]. Son identité moléculaire n'a été révélée que 10 ans plus tard, grâce au clonage et séquençage de son ADNc[2-4].
Dans le même temps, un facteur cytotoxique a été isolé d'une lignée de cellules B lymphoblastoïdes, et nommé lymphotoxine ; il a été renommé plus tard TNF-β[5]. L'analyse de leur séquence peptidique et de leur ADNc a révélé que le TNF-α et le TNF-β ont 50% d'homologies en acides aminés.

I.1.2 *La superfamille du TNF*

Depuis la découverte du TNF-α, la superfamille des tumor necrosis factor, formée des facteurs solubles et membranaires régulant les systèmes de défense immunitaire, la survie cellulaire et l'organogenèse s'est considérablement agrandie, et compte plus de 40 systèmes ligands-récepteurs[6]. Les membres de la famille du TNF sont des ligands liés à la membrane ou sécrétés, et se liant à un ou plusieurs récepteurs spécifiques à la surface des cellules, formant une famille homologue à celle des récepteurs du TNF. Cette superfamille n'existe que chez les vertébrés et sa nomenclature tente d'être standardisée (http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/).

Cette famille est définie par des homologies de séquences et de structures dans les ligands et récepteurs, par rapport au système TNF-TNFR. Ainsi, les récepteurs possèdent un ou plusieurs domaines riches en cystéine (CRD). Les ligands sont, comme le TNF, des protéines transmembranaires de type II, avec un domaine homologue au TNF (THD) en C-terminal ; ces THD se replient en sandwiches antiparallèles qui forment un trimère, chaque ligand ayant ainsi trois sites de liaison[7]. Le ligand étant multivalent, les récepteurs se regroupent (clustering) afin de permettre la liaison du ligand et la transduction du signal.

I.1.3 *Gène et protéine*

Le gène du TNF-α humain est localisé sur le chromosome 6, dans une région entre p23 et q12, proche de l'ensemble des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La protéine est codée par un gène unique de 3,6 kb, comportant trois introns et quatre exons[8].
Le TNF-α est une protéine transmembranaire de type II de 233 acides aminés, avec une extrémité C-terminale externe à la cellule et un domaine cytoplasmique.
Cette protéine peut être clivée par une métalloprotéase membranaire appelée TNF convertase enzyme (TACE). Le TNF-α ainsi libéré (17 kD) peut s'assembler en trimère circulant[9]. L'extrémité C-terminale de chaque sous-unité est incorporée dans la base du trimère, l'extrémité N-terminale restant relativement libre. Ainsi, le TNF-α peut exercer sa fonction soit à distance par la forme soluble, soit lors de contact intercellulaire par la forme membranaire.
La structure tridimensionnelle du TNF-α a été résolue simultanément par deux équipes[10,11], et a été récemment décrite à haute résolution[12]. Le TNF soluble est décrit comme une protéine en forme de

cône, de telle sorte que chaque molécule est en contact avec les deux autres, la zone de contact entre les monomères étant la hauteur du cône. Chaque monomère correspond à deux feuillets β anti-parallèles. Le feuillet externe est riche en résidus hydrophiles, tandis que le feuillet interne est hydrophobe et contient l'extrémité C-terminale, qui se trouve proche de l'axe central du cône formé par le trimère[13,14].

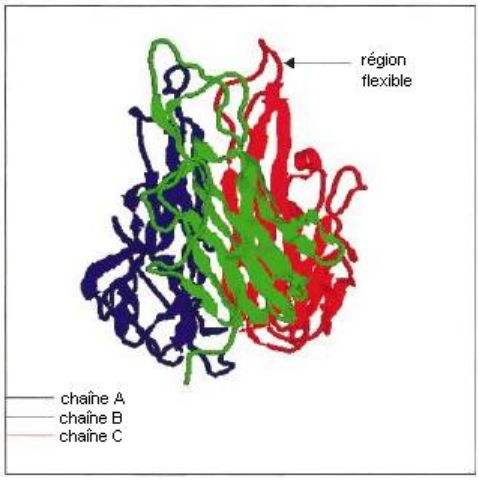


Figure 1 : Structure tridimensionnelle du TNF-α trimérique. Mise en évidence de sa forme conique (d'après Eck et al[11]).

I.1.4 *Production de TNF-α*

I.1.4-a) Source cellulaire du TNF-α

De nombreuses cellules produisent le TNF-α. Les monocytes et les macrophages sont les principales sources de TNF-α, mais les lymphocytes T et B et les cellules natural killer (NK), les polynucléaires (surtout les neutrophiles), les mastocytes, les fibroblastes, les chondrocytes, les astrocytes, les cellules microgliales, les cellules endothéliales activées, les kératinocytes et les cellules épithéliales digestives en produisent aussi[15].
L'expression du gène du TNF-α est stimulée par une large variété d'agents, essentiellement des facteurs bactériens et des stimuli immunologiques. Concernant les macrophages, l'expression du TNF-α est induite par des stimuli biologiques, chimiques et physiques, tels que des produits issus de virus, bactéries ou parasites, des cellules tumorales, le complément, des cytokines (IL-1, IL-2, IFN-γ, GM-CSF, M-CSF, et TNF-α lui-même), l'ischémie, le trauma, les irradiations. Pour les autre types cellulaires, d'autres stimuli peuvent être efficaces : le LPS pour les monocytes, les rayonnements ultraviolets pour les fibroblastes, les esters de phorbol et infections virales pour de nombreux autres types cellulaires.

I.1.4-b) Signalisation intracellulaire[16]

✓ ***Polymorphisme***

Le promoteur du TNF-α possède des sites de fixation pour différents facteurs de transcription, principalement NF-κB et AP-1, mais aussi AP-2, NF-AT (nuclear factor of activated T cell), CRE (cyclic adenosine monophosphate response element), …[17]. Ces différents facteurs de transcription peuvent varier et interagir de façon différente selon le type de stimulus et le type de cellule stimulée.
Le polymorphisme du promoteur du TNF-α influence les capacités individuelles de synthèse du TNF, et donc potentiellement la susceptibilité aux maladies inflammatoires (production élevée de TNF) et aux risques d'infections (faible production de TNF).

✓ ***Voie du "nuclear factor-κB" (NF-κB)***

La transduction du signal fait suite à la fixation du stimulus (physique (UV, RX, chaleur), chimique, immunologique, infectieux) sur son récepteur membranaire. Cette activation agit sur NF-κB qui, à l'état basal, est séquestré dans le cytoplasme des cellules non activées par les molécules inhibitrices de la famille IκB. L'activation cellulaire provoque une phosphorylation de l'inhibiteur IκB par un complexe IκK. IκB ainsi phosphorylé libère NF-κB puis est dégradé dans le protéasome. NF-κB libre transloque alors vers le noyau où il exerce son rôle d'activateur de la transcription.

✓ ***Voie des "mitogen ativated protein kinase" (MAPK)***

Dans ce cas, la liaison du stimulus à son récepteur induit le recrutement de protéines intracellulaires (TRAF, TRADD et RIP) qui induisent une cascade de phosphorylation via JNK et p38. Les MAPK aboutissent ensuite à l'activation du facteur de transcription AP-1.

I.1.5 *Régulation de la synthèse du TNF-α*

Le TNF-α est produit à des niveaux indétectables dans les cellules quiescentes, mais dans les macrophages activés, le TNF-α est une des principales protéines sécrétées. Le gène du TNF-α est un gène de la réponse immédiate ; les niveaux d'ARNm augmentent brusquement en 15 à 30 minutes.

I.1.5-a) Régulation post-transcriptionnelle de l'expression du TNF-α[18]

La région 3' de l'ARNm du TNF-α comprend une série de séquences AU, appelée AURE (adenosine-uridine rich element) rendant l'ARNm du TNF-α instable[19]. Cette séquence permet ainsi de régler la dégradation et la traduction de l'ARNm du TNF-α mais aussi d'autres cytokines et facteurs de croissance. Han et Beutler ont ainsi montré que la présence de cette séquence AURE est responsable à la fois de la suppression de la traduction de l'ARNm du TNF-α quand les cellules ne sont pas stimulées, mais aussi de la dérepression qui apparaît lorsque les macrophages sont stimulés au LPS[19]. L'importance de ces séquences est démontrée par un modèle animal transgénique dont l'ARNm du TNF-α n'a pas de séquences AURE. Ces animaux, qui produisent du TNF-α en excès, développent des arthrites chroniques et une maladie inflammatoire digestive[20]. Ainsi, la capacité de différents tissus à exprimer le TNF-α semble dépendre autant de sa régulation transcriptionnelle que de la possibilité de déréprimer les signaux de la région 3'.

L'action de la séquence AURE semble liée à la fixation de protéines spécifiques (TIA-1, TIAR, tristetrapolin (TTP), Hel-N1, HuR AUF1) appelées AURE binding-protein (AUBP) qui agissent par différents mécanismes :

- La TTP est une AUBP qui facilite la dégradation de l'ARNm du TNF-α spécifiquement macrophagique. Les souris déficientes en TTP hyperexpriment le TNF-α et son ARN, et développent une cachexie, une arthrite, et des signes d'auto-immunité.
- Les protéines TIA-1 et TIAR agissent comme des régulateurs transcriptionnels. Les souris déficientes en TIA-1 ou TIAR ont des macrophages capables de secréter de grandes quantités de TNF-α lors de la stimulation par le LPS.

Ainsi, à l'état basal (non activé), la séquence AURE fixe des protéines AUBP qui agissent en bloquant l'ARNm du TNF-α. Lors de l'activation de la cellule, ce blocage est levé par des mécanismes qui restent à élucider. Il a été montré que l'activité des protéines TIA-1 et TIAR peut être inhibée par leur phosphorylation par la MAPK2 de la voie p38[21]. Ainsi, il n'y a plus de stabilisation ou de dégradation de l'ARNm du TNF-α par les séquences AURE, et le TNF est libéré en grandes quantités.

I.1.5-b) Régulation de la libération du TNF membranaire

La forme soluble de TNF-α est libérée par la métalloprotéase TACE ; cependant d'autres enzymes comme les MMP-7, MMP-14, et MMP-17 sont aussi capables de le faire[22]. Les phénomènes régulant l'activité de ces enzymes protéolytiques sont mal connus mais ces enzymes semblent avoir un rôle majeur dans le développement, comme le suggère la létalité des souris déficientes en TACE[23].
Les récepteurs du TNF-α sont aussi libérés par des enzymes protéolytiques, et la TACE semble intervenir dans la libération du TNFR-II soluble. Or ces récepteurs solubles sont des inhibiteurs physio logiques de TNF-α. La TACE joue donc à la fois un rôle activateur du TNF-α en favorisant sa libération membranaire, mais aussi un rôle de régulation négative en libérant du TNFR-II soluble, qui forme un complexe avec le TNF-α et inhibe sa bioactivité.

I.1.5-c) Régulation de la sécrétion de TNF-α

Différents mécanismes de régulation non spécifiques sont mis en jeu, en particulier via la synthèse de nucléosides cycliques (AMPc, GMPc) qui sont capables d'interférer avec les facteurs de transcription du TNF. Schématiquement, la synthèse de TNF est inhibée par l'AMPc et augmentée par le GMPc intracellulaire.
Les prostanoïdes interfèrent particulièrement avec la synthèse de TNF. La prostaglandine E2 (PGE2), mais aussi la PGI2 (prostacycline) sont capables d'avoir un effet anti-inflammatoire en bloquant la synthèse du TNF. Ce rôle anti-TNF de la PGE2 a été déterminé dans des modèles expérimentaux de colite, la muqueuse intestinale étant un site de synthèse du TNF. Ainsi, un AINS qui bloque la synthèse de PGE2 induit la synthèse de TNF muqueux, favorisant l'apparition de lésions intestinales[24]. Différents mécanismes expliquent cet effet anti-TNF des prostanoïdes :

- Les PGE2 et PGI2, dont la synthèse est induite par le TNF, exercent un rétrocontrôle négatif, inhibant la synthèse du TNF en augmentant la concentration intracellulaire en AMPc.
- La PGE2 induit aussi la synthèse d'IL-10 qui a une double action anti-inflammatoire[25] : l'IL-10 inhibe l'activité macrophagique et favorise la synthèse de PGD2 au détriment de la synthèse de PGE2 ; cette prostaglandine à cyclopenténone induit la répression des gènes pro-inflammatoires (iNOS et TNF) des macrophages activés en inactivant les principaux facteurs de transcription (STAT-1, AP-1, NF-κB). Cette boucle de rétrocontrôle peut devenir particulièrement importante dans le cas de maladies inflammatoires chroniques, dans lesquelles la production de TNF-α reste anormalement maintenue, comme dans le cas de la synoviale arthritique[26].

Récemment, il a été montré que l'apolipoprotéine A1 inhibe l'inflammation monocytaire et en particulier la synthèse de TNF-α. Cette inhibition peut être liée à une action spécifique directement via un récepteur monocytaire ou plus vraisemblablement par une inhibition de l'activité monocytaire par les lymphocytes T[27].

I.2. Les récepteurs du TNF-α

I.2.1 *Présentation*

Les deux récepteurs de forte affinité du TNF-α ont été découverts en 1985 par Aggarwal *et al* par chromatographie d'affinité[9]. En 1990, l'ADNc des deux récepteurs a été isolé, et a permis d'identifier deux protéines de taille 55kD et 75kD, nommées respectivement p55 ou TNFR-I et p75 ou TNFR-II[28-30]. Les TNFR sont chacun encodés par un unique gène, localisé sur le chromosome 12p13 et constitué d'au moins trois exons pour le TNFR-I, et sur le chromosome 1p36 avec dix exons et neuf introns pour le TNFR-II.
Le TNFR-I comporte 426 acides aminés, et le TNFR-II 439 acides aminés. Ce sont des protéines glycosylées transmembranaires de type II, dont les domaines extracellulaires contiennent quatre CRD bien conservés. Par contre, leurs domaines intracellulaires sont très différents, indiquant des voies de

transductions distinctes. Dans ces domaines intracellulaires, on note la présence d'un domaine de mort pour le TNFR-I, nommé ainsi à cause de son importance dans la mort cellulaire induite par le TNF-α[31]; le TNFR-II ne possède pas ce domaine de mort, mais une région riche en sérine qui subit des phosphorylations.

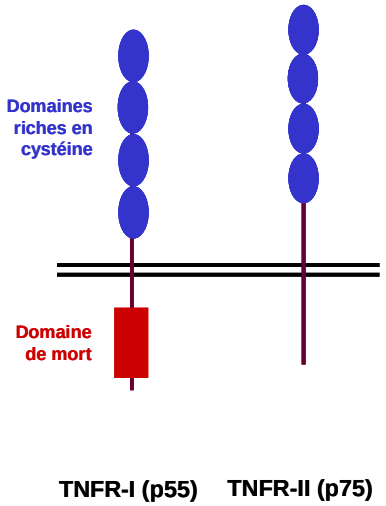


Figure 2 : Représentation schématique des récepteurs de type I et II du TNF-α.

Le TNFR-I est exprimé sur la plupart des cellules tandis que le TNFR-II est essentiellement exprimé à la surface des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire[32]. Le nombre de récepteurs varie de 200 à 10 000 par cellule.

I.2.2 *Liaison avec le TNF-α*

Les deux récepteurs présentent une forte affinité pour le TNF-α, avec une constante de dissociation à 37°C d'environ $1{,}9.10^{-11}$ et $4{,}2.10^{-10}$ M pour les TNFR-I et TNFR-II, respectivement[33].
Les interactions entre le TNF-α et ses récepteurs ont lieu dans les domaines CRD2 et CRD3 des récepteurs[34,35], ceux-ci se liant dans les sillons externes entre les trois sous-unités du TNF-α[11]. Des études de mutagenèses dirigées permettent d'identifier précisément les domaines d'interactions fondamentales entre le TNF-α et ses récepteurs en déterminant les affinités entre le TNF-α et des récepteurs mutés[36].

L'action du TNF débute par sa fixation sur son récepteur membranaire présent sur les cellules cibles. La liaison d'une molécule de TNF-α à un seul monomère de récepteur n'est pas suffisante pour induire une transduction du signal ; celle-ci nécessite en effet la dimérisation ou la trimérisation des domaines intracellulaires des récepteurs. Plusieurs hypothèses ont été avancées concernant le mode de liaison du TNF à son récepteur[14] (Figure 3) :

- Hypothèse de trimérisation : trois récepteurs s'associent et se lient à un seul TNF-α trimérique.
- Hypothèse de réseau : la liaison du TNF-α trimérique à un dimère de TNFR crée un réseau hexagonal de complexes ligand/récepteur qui se développe. Chaque molécule de TNF-α est liée à trois dimères différents de récepteur ; c'est alors le recouvrement des récepteurs qui induit un signal.
- Hypothèse de switch moléculaire : chaque récepteur associé en dimère A/B est une unité activable. La liaison du TNF à la sous-unité B entraîne la dissociation du dimère de récepteur A/B, et le

récepteur A se lie à une autre partie du TNF trimérique. Cette série d'événements génère des changements conformationnels qui induisent la transduction du signal.

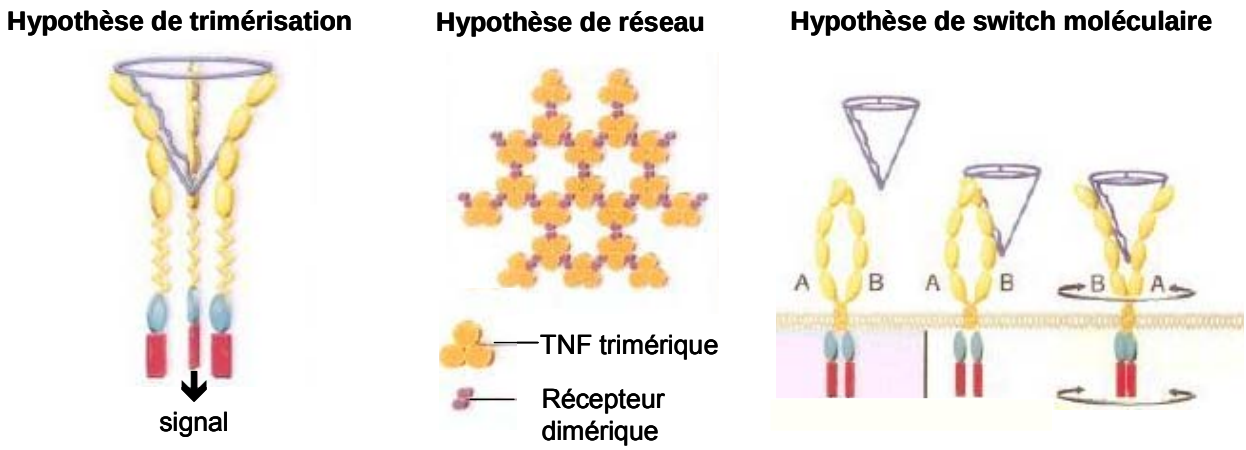


Figure 3 : Trois modèles décrivant le mode de liaison du TNF-α à ses récepteurs. D'après Bazzoni et Beulter[15].

De plus, il a été récemment démontré qu'avant la fixation de son ligand, les récepteurs de type I ou II peuvent s'assembler en complexes par le domaine N-terminal de leurs régions extracellulaires, appelé PLAD (pre-ligand-binding assembly domain)[37]. Ces PLAD sont distincts de la zone d'interaction du ligand avec le récepteur, mais sont néanmoins essentiels pour obtenir la liaison du TNF-α et son efficacité. L'association préférentielle de TNFR-I ou TNFR-II entre eux semble être trimérique, cependant, le TNFR-I peut être trouvé sous forme de dimère.

I.2.3 *Voies de signalisation intracellulaire*

La fixation du TNF-α sur son récepteur aboutit soit à l'activation des voies d'apoptose, soit à l'activation des voies de la transcription de gènes impliqués dans l'immunité et l'inflammation[38-40].

L'activation de la voie inflammatoire et anti-apoptotique, via les MAPK et NF-κB, se fait par stimulation des TNFR-I et II :

- L'activation de TNFR-II se traduit par le recrutement de TRAF2 (TNFR associated factor-2), qui lui-même recrute TRAF1. TRAF2 est l'intermédiaire clef de la signalisation permettant d'activer la voie des MAPK et de NF-κB.
- L'activation de TNFR-I se traduit d'abord par le recrutement de TRADD (TNFR associated death domain) qui lui-même peut recruter TRAF2, les protéines RIP1, 2, et 3.

Cette activation aboutit à la transcription de nombreux gènes (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, sélectine, ICAM, VCAM, IFN-γ, TGF-β, iNOS, COX2,…) mais aussi du TNF-α lui-même.

L'induction de l'apoptose est liée à l'activation du TNFR-I, par la formation d'un complexe intracellulaire TRADD-FADD (fas associated death domain) qui active la voie des caspases 8 et 10.

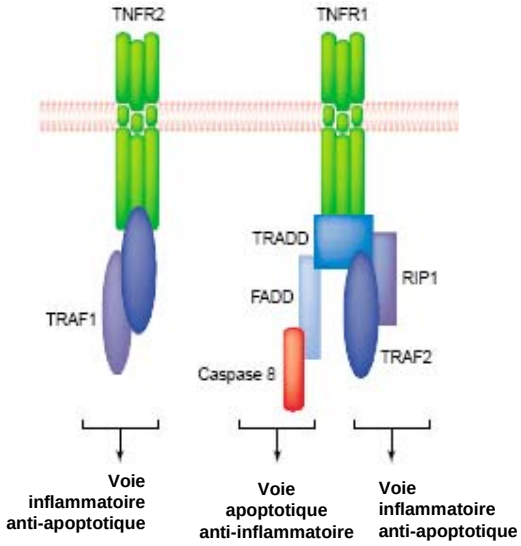


Figure 4 : Premiers éléments des voies de signalisation du TNF-α via le TNFR-I et le TNFR-II, et leur relation avec l'activation et l'inhibition de l'apoptose et de l'inflammation (d'après Baud et al[40]).

Plus rarement, l'activation des TNFR pourrait induire une destruction cellulaire non via une apoptose, mais par l'induction d'une véritable nécrose indépendante de l'activation des caspases. Ainsi, le virus de la vaccine, qui possède un inhibiteur des caspases, rend les cellules qu'il infecte résistantes à l'apoptose ; cependant le TNF-α est capable de détruire les cellules infectées par l'induction d'une nécrose[41].

Cette signalisation intracellulaire fait elle aussi l'objet d'une régulation, surtout la voie apoptotique :

- La BRE (brain-reproductive) est une protéine surtout synthétisée dans le cerveau et le système reproducteur qui inhibe l'activation de NF-κB via le TNFR-I.
- Le SODD (silencer of death domain) est un peptide qui se fixe sur le segment intracellulaire DD du TNFR-I. Il inhibe ainsi l'activation de ce récepteur, en particulier le signal d'apoptose.
- TRAF2 recruté par l'activation des TNFR est capable de réguler la production de TNF-α comme le suggère l'excès de synthèse de TNF-α chez les souris déficientes en TRAF2[42].
- Les inhibiteurs de l'apoptose cellulaire (cIAP) et les inhibiteurs des DNases activées par les caspases (ICAD) sont des peptides qui inhibent l'apoptose en bloquant les caspases 3, 7, et 9.
- Le peptide A20 interagit avec TRAF2, protégeant ainsi la cellule de l'apoptose induite par le TNF-α. Sa synthèse est induite par le TNF-α, suggérant qu'il participe à un rétrocontrôle dépendant du TNF[43].

Ainsi, la plupart de ces protéines régulatrices sont spécifiques des voies du TNF-α et ont surtout pour rôle de réguler l'apoptose induite par le TNF.

I.2.4 *Récepteurs solubles*

Les récepteurs solubles du TNF-α ont été découverts en 1990, à partir d'urines qui contenaient une protéine capable de se lier au TNF-α et d'empêcher sa toxicité[44,45], ensuite identifiée comme un fragment du récepteur du TNF[46].

Les deux types de récepteurs solubles TNFR-Is (30kD) et TNFR-IIs (40kD) peuvent être libérés en réponse à certains stimuli. Ils ont été détectés *in vivo*, dans le sérum, liquide synovial[47], fluides cérébro-spinaux et urine. Ces récepteurs solubles sont formés à partir des récepteurs transmembranaires, par clivage du domaine extracellulaire du récepteur par des enzymes

protéolytiques. La TACE est aussi impliquée dans la libération des récepteurs solubles. Ils conservent la même affinité pour le TNF-α que leur précurseur transmembranaire.
Le rôle physiologique des récepteurs solubles n'est pas entièrement élucidé. Ils ont tout d'abord été décrits en raison de leur capacité à entrer en compétition avec les récepteurs du TNF localisés à la surface des cellules, inhibant ainsi les fonctions des cytokines. Il a ainsi été découvert que les récepteurs solubles du TNF-α protègent les animaux contre les effets létaux de l'endotoxémie[48]. Cependant, dans cette même étude, une cytotoxicité tardive induite par le TNF-α a été observée. Ces résultats suggèrent donc que les TNFRs sont également capables de maintenir le TNF à une concentration biologiquement active, en jouant le rôle de réservoir de TNF. Ces différents mécanismes semblent dépendre du ratio TNF-α/TNFR : des concentrations élevées de TNFRs inhibent l'activité du TNF-α, tandis que de faibles concentrations le stabilisent et améliorent ses propriétés pharmacocinétiques, du fait d'une dégradation protéolytique et/ou excrétion urinaire réduite, et augmentent ainsi ses effets[49].

I.3. Activités biologiques du TNF-α

Historiquement, le TNF-α a été découvert pour son effet protecteur contre les tumeurs. Cette cytotoxicité sur cellules malignes est améliorée par combinaison du TNF-α avec l'IFN-γ[50], cette association permettant le traitement de tumeurs agressives chez l'animal. Cependant, les concentrations de TNF-α requises sont assez élevées et risquent d'être toxiques chez l'homme (maximum toléré chez l'homme : 200 µg/m^2).
Le TNF-α exerce un grand nombre d'activités, notamment dans la physiologie du développement embryonnaire[51], et la régulation du sommeil[52]. Son rôle principal est d'assurer la défense anti-infectieuse de l'organisme[53].

L'inflammation ou réaction inflammatoire est un phénomène réactionnel mis en œuvre par l'organisme chaque fois que l'intégrité de ses constantes morphologiques et biologiques est menacée. Les causes exogènes de l'inflammation peuvent être des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons), un traumatisme, un corps étranger, ou des agressions d'origine physique (radiations) ou chimique (toxiques).
Le rôle du TNF-α dans l'inflammation est crucial. Son action physiologique se caractérise par une action sur de multiples cibles tissulaires et cellulaires dont l'objectif commun est la défense de l'organisme.

Le TNF-α exerce une action centrale sur la thermorégulation se traduisant par de la fièvre.

I.3.1 *Les cellules cibles du TNF-α*

Le TNF-α est un puissant activateur des monocytes et des macrophages pour amplifier la réaction inflammatoire. Il stimule aussi l'activité cytotoxique des macrophages ainsi que leur chimiotactisme.
Il augmente la migration des PNN à l'aide d'un gradient chimiotactique de TNF.
Le TNF-α joue aussi un rôle dans la génération d'une réponse immune spécifique impliquant les lymphocytes T et B spécifiques d'antigène, et l'initiation d'une réponse mémoire. Il augmente en effet la production de cellules Th. Il contrôle directement et indirectement, par l'intermédiaire d'autres cytokines, la prolifération des cellules B et leur différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps.
Le TNF-α exerce aussi une action cytotoxique sur les cellules infectées par deux voies, apoptose ou lyse cellulaire.

Le TNF-α joue un rôle dans l'hématopoïèse par une action directe et via les cytokines et les facteurs de croissance ; il induit ainsi une anémie, une thrombocytose, et une polynucléose.

Au-delà des cellules du système immunitaire, le TNF-α induit l'activation et la prolifération des fibroblastes et des cellules synoviales. Il stimule les ostéoclastes et la destruction osseuse, et inhibe la synthèse de matrice extracellulaire par les ostéoblastes et les chondrocytes[54] .

I.3.2 ***Les actions cellulaires du TNF-α***

Le TNF-α induit la synthèse des protéines de l'inflammation (CRP) d'origine hépatique via l'IL-6.
Dans l'endothélium, il augmente la perméabilité vasculaire, induit l'activité procoagulante, et l'expression des molécules d'adhésions (ICAM-1, VCAM-1, sélectines)[55,56] et des chimiokines (MCP-1, IL-8,…)[57,58]. Ces molécules favorisent le recrutement de cellules sur les sites inflammatoires.
Le TNF-α induit la libération de molécules de la défense immédiate (radicaux libres, monoxyde d'azote[59], métalloprotéases, PGE2, PAF) par les neutrophiles, les cellules endothéliales, les chondrocytes[60], les synoviocytes de type fibroblastes [61], … Ces médiateurs modulent les phénomènes primaires de l'inflammation comme la vasodilatation, la perméabilité, le chimiotactisme, et favorisent les mécanismes de destructions tissulaires.
Le TNF-α active la transcription de différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6,…) et de facteurs de croissance (GM-CSF) pour amplifier la réponse inflammatoire. Il joue un rôle d'auto-activation puisqu'il induit sa propre synthèse.
Le TNF-α augmente l'expression des facteurs d'angiogénèse (VEGF, VCAM), et facilite ainsi la néoangiogénèse.
Il induit la synthèse de MMPs de type collagénase (MMP-1), gélatinases (MMP-2 et 9) et stromélysine 1 (MMP-3).

II. Rôle du TNF-α dans différents types de pathologies

Nous nous sommes intéressés dans nos travaux à des pathologies différentes, ayant toutes une composante inflammatoire, et dans lesquelles le TNF-α joue bien sûr un rôle majeur.
L'inflammation peut être la composante prépondérante, voire unique de la pathologie ; dans ce cas le TNF-α joue un rôle central et son action délétère est directe ; il est à l'origine des symptômes de la pathologie. C'est le cas pour le choc septique ou les uvéites purement inflammatoires.
Un traumatisme crânien, quant à lui, induit de multiples effets dont une composante inflammatoire d'importance variable. Le TNF n'est donc pas une cible directe pour le traitement de cette pathologie, d'autant que son rôle peut y être délétère ou réparateur selon la phase de la maladie. Cependant l'étude des effets du TNF reste importante et prometteuse.
Dans le cas des maladies auto-immunes, l'inflammation est la conséquence d'une réponse à un ou plusieurs auto-antigènes. Ces antigènes sont les vraies cibles thérapeutiques, mais dans les uvéites ou la polyarthrite rhumatoïde, ils restent pour le moment inconnus. Dans ces pathologies, l'inflammation est le processus destructeur majeur, et le rôle délétère du TNF-α y est donc très important, même s'il n'est pas à l'origine de la maladie.

II.1. Inflammation aiguë : le choc septique

La description du processus inflammatoire au cours du choc septique est intéressante car le TNF-α y est le médiateur fondamental. Les effets du TNF-α sont donc très caractéristiques.

II.1.1 *Présentation*

Le choc septique est la cause de mortalité la plus fréquente dans les unités hospitalières de soins intensifs. Aux Etats-Unis, l'incidence du choc septique est estimée à 400 000 cas par an, avec un taux de mortalité de 40%[62].
Le choc septique apparaît comme une complication d'une maladie infectieuse. En effet, la présence de bactéries dans le sang reste relativement commune, et ne conduit généralement pas à de telles complications. Le choc septique est une réponse systémique à une infection avec hypotension.

Les endotoxines, lipopolysaccharides associés à la membrane cellulaire des bactéries Gram-négatives sont des médiateurs importants du choc septique. Leur présence dans la circulation stimule la production de médiateurs de l'inflammation comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF-α, ce qui conduit à l'activation en cascade de cytokines, et à la production de médiateurs secondaires, lesquels entraînent des effets délétères plus ou moins sévères.

Des études réalisées chez des jumeaux ont permis de mettre en évidence des facteurs génétiques de susceptibilité au choc septique. Ce sont principalement des polymorphismes sur les gènes des récepteurs du TNF-α, de l'IL-1, des Fcγ et des TLR[63].

II.1.2 *Déroulement de l'inflammation au cours du choc septique*

Les patients subissant un choc septique présentent une réponse immune biphasique[64]. La première manifestation de l'infection est une inflammation très forte, suivie d'une période d'immunodépression.

II.1.2-a) La réaction inflammatoire

L'agent infectieux stimule les monocytes/macrophages qui produisent alors des cytokines. Les premiers médiateurs mis en jeu sont le TNF-α et l'IL-1[65] ; ils agissent directement sur la fonctionnalité des organes, et indirectement par la production de médiateurs secondaires, qui résultent en l'activation d'une cascade de cytokines.
Dans le cas des endotoxines, l'agent infectieux se lie à la LPS binding protein (LBP) sur les monocytes et autres cellules myéloïdes, puis le complexe LPS-LBP interagit avec le toll like recepteur 4 (TLR4) situé à la surface des monocytes/macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques[66].
Les cytokines proximales TNF-α et IL-1 stimulent la production d'IL-6 et d'IL-8 (cytokines distales ou tardives), de leukotriènes, de PAF, de prostaglandines, et du complément. L'IL-6 est aussi un médiateur pléïotropique qui active les lymphocytes, la coagulation, et induit la synthèse des protéines hépatiques aiguës de l'inflammation. L'IL-8 est quant à elle un facteur chimiotactique puissant pour les leucocytes circulants[62].

Les agents infectieux sont aussi capables de se lier à des récepteurs cellulaires qui activent des protéines régulatrices, comme le facteur de transcription NF-κB, ce qui stimule la production de cytokines.
Ces médiateurs pro-inflammatoires conduisent aussi à la libération de NO• par les macrophages, les cellules endothéliales, et les cellules musculaires lisses. La libération de radicaux nitrés qui en résultent (peroxynitrite, radical superoxyde,…) est délétère pour les cellules, augmente la perméabilité intestinale, et crée une dépression myocardique. L'expression de molécules d'adhésion sur les neutrophiles et les cellules endothéliales est aussi stimulée par les médiateurs de l'inflammation. L'afflux de neutrophiles activés dans l'espace extravasculaire entraîne des dommages microvasculaires et tissulaires. De même, le TNF-α et l'IL-1 augmentent l'expression de facteur tissulaire (FT) sur les cellules endothéliales, ce qui conduit à un dépôt de fibrine et au développement de phénomènes de coagulation disséminés.

II.1.2-b) Régulation de l'inflammation et immunodépression

Des médiateurs anti-inflammatoires sont aussi libérés durant le choc septique, afin de moduler la réponse inflammatoire. Les taux de corticostéroïdes et catécholamines endogènes sont élevés, et on observe aussi une libération importante d'IL-10, IL-4, PGE2, TNFR, IL-1Ra. Ces molécules altèrent la réponse immune au point d'entraîner une phase d'immunodépression. Celle-ci se caractérise par une baisse du nombre de monocytes activés ainsi que de leur expression de molécules CMH-II. Si cette phase se poursuit, elle conduit à une augmentation des risques d'infection et de mort.

II.1.3 *Rôle majeur des cytokines*

Le rôle fondamental des cytokines dans le déroulement du choc septique s'appuie sur trois critères :

- Les taux de TNF-α plasmatique sont élevés chez les patients et sont corrélés aux chances de survie[67].
- L'injection de TNF-α ou d'IL-1 chez l'animal induit des modifications semblables à celles observées chez les patients atteints de choc septique[68].
- L'inhibition du TNF-α ou de l'IL-1 dans des modèles animaux protège de la mort et de la destruction d'organe. Ainsi, l'infusion d'anticorps anti-TNF chez le babouin deux heures avant induction du choc septique prévient la mortalité et l'atteinte des organes[69]. L'importance des deux récepteurs du TNF dans le déroulement du choc septique a été démontrée. Ainsi, des animaux invalidés pour le TNFR-I et soumis à un choc septique par le LPS ou l'endotoxine A deviennent résistants ; par contre,

l'utilisation de *L. monocytogènes* comme agent inducteur entraîne la mort des souris[70]. De même, l'importance du récepteur de type II du TNF a été montrée dans un modèle de choc septique induit au PEA (exotoxine A de *Pseudomanas aeruginosa*) chez des souris invalidées pour ce récepteur[71].

De manière surprenante, et contrairement aux résultats obtenus dans les modèles animaux, les résultats de récentes études cliniques ne montrent pas d'effet bénéfiques des traitements anti-cytokine, anti-TNF ou anti-IL-1[72,73]. Une étude réalisée avec une protéine fusionnée TNFR-II/IgG1 augmente même la mortalité aux doses les plus fortes[74].
Le rôle uniquement délétère des cytokines, et en particulier du TNF-α, doit être considéré avec prudence dans le choc septique. De plus, la pertinence des modèles animaux doit être considérée avec attention. Ainsi, l'étude du modèle animal de ligature du secum et ponction (CLP), proche d'une péritonite humaine, indique la nécessité de TNF-α pour la survie des animaux[75].

II.1.4 *Approches thérapeutiques*

Outre l'utilisation d'anti-cytokines, des anticorps IgM bloquant le LPS ont été testés au début des années 90 sans succès. Les corticoïdes à forte dose sont efficaces, mais peu spécifiques ; les inhibiteurs de COX comme l'ibuprofen sont efficaces à court terme. La compréhension des mécanismes impliqués dans le choc septique favorise le développement de traitements plus ciblés, comme la voie du TLR4[72].
Fin 2001, le premier médicament spécifique du choc septique, une protéine C activée inactivant les facteurs V et VIII et agissant donc comme anticoagulant, a été autorisé aux Etats-Unis. De nombreux autres composés sont aujourd'hui en essai clinique[76].

II.2. Le traumatisme crânien

II.2.1 *Présentation*

II.2.1-a) Définition

Le traumatisme crânien résulte généralement d'un impact mécanique (choc céphalique) ou d'un phénomène d'accélération-décélération (inertie de l'extrémité céphalique) qui cause des fractures du crâne, la compression des tissus cérébraux, et le déchirement de la matière blanche et grise, avec pour résultats des hémorragies.
Le traumatisme crânien est un problème clinique majeur avec un fort taux de mortalité et des conséquences comportementales et socio-économiques à long terme. En Europe, le traumatisme crânien représente 2% des causes de décès dans la population générale et environ 40% dans la tranche des 15-25 ans, avec un ratio homme/femme de 3 pour 1[77]. Aux Etats-Unis, le nombre annuel de victimes est estimé à 1,5 million[78] .
L'analyse des étiologies montre que 60 à 70% des cas sont liés à des accidents de voirie, avec un pic de fréquence très net pour les 15-25 ans. Les chutes concernent plutôt les enfants et les personnes âgées, mais peuvent aussi survenir dans d'autres tranches d'âge lors d'accident de travail ou sportif par exemple.
Outre bien sûr la zone du cerveau lésée et l'intensité du traumatisme, les facteurs influençant la survenue d'un traumatisme crânien sont principalement humains et socio-économiques. Les troubles du caractère, modifiés ou non par la prise d'alcool et/ou de drogues favorisent les conduites à risque. Des difficultés personnelles sont aussi un facteur de prédisposition à l'accident[77].

II.2.1-b) Classification des traumatismes crâniens

Les patients traumatisés crâniens sont classés selon la gravité clinique et la nature de la blessure du crâne (traumatisme crânien fermé, fracture avec enfoncement et fracture ouverte du crâne). Un examen neurologique a pour but d'apprécier objectivement les fonctions des hémisphères cérébraux et du tronc cérébral. La plus reconnue des échelles spécifiques établie à cet effet est l'échelle de coma de Glasgow (GCS)[79]. Elle repose sur une description simple des troubles observés concernant : l'ouverture des yeux, la réponse vertébrale, les réflexes du tronc, et permet ainsi de se faire une idée de l'état de conscience et donc de la gravité du traumatisme crânien. Les patients sont alors classés en trois catégories selon la gravité du traumatisme : léger, modéré, ou sévère.

II.2.1-c) Aspects cliniques/physiopathologie

Les lésions post-traumatiques sont des lésions dynamiques qui évoluent selon un schéma commun à de nombreuses pathologies cérébrales à caractère neurodégénératif. La singularité de la pathologie traumatique tient aux lésions mécaniques immédiates consécutives au choc qui peuvent affecter le cerveau à la fois au niveau vasculaire et du parenchyme. Parmi ces lésions primaires, on distingue les lésions focales, qui se caractérisent par une destruction locale et massive du tissu, des lésions axonales diffuses, qui ne sont pas confinées à une région anatomique mais largement disséminées dans le cerveau et le tronc cérébral.
Le schéma physiopathologique de traumatisme crânien est déterminé par les effets conjugués de l'évolution de ces lésions, leurs contributions relatives étant fonction de la sévérité du choc traumatique et de sa localisation. Cette évolution est marquée par des désordres métaboliques et inflammatoires qui sont à l'origine des lésions secondaires[80].
En effet, dans le tissu cérébral déjà fragilisé par les lésions initiales, se mettent en place des perturbations à la fois cérébrales et systémiques qui s'auto-alimentent, constituant une véritable spirale d'auto-activation. Le trauma induit la formation d'un œdème qui comprime le cerveau, conduisant à l'augmentation de la pression intracrânienne (PIC) et à la compression des vaisseaux (ischémie cérébrale). En retour, le débit sanguin chute, avec pour conséquence une perte d'oxygénation des cellules qui meurent par nécrose et la formation d'un œdème autour de la zone de nécrose. L'œdème additionnel comprime le tronc cérébral et les centres respiratoires et vient majorer l'augmentation de la PIC. Ces derniers mécanismes conduisent à l'accumulation de CO_2, entraînant une vasodilatation et donc une augmentation du volume sanguin cérébral. Ces perturbations hémodynamiques sont auto-alimentées et peuvent continuer leur progression jusqu'à la mort cérébrale.
Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à la formation des lésions cérébrales peuvent être classées en trois grands mécanismes de base :

- Les dysfonctionnements de récepteurs
- Les altérations induites par les radicaux libres
- Les processus inflammatoires

Dans le cadre de nos travaux, nous nous intéresserons plus précisément aux processus inflammatoires.

II.2.2 *Inflammation cérébrale post-traumatique*

Le processus inflammatoire au cours du traumatisme crânien fait l'objet d'un intérêt croissant. Il se caractérise par une infiltration des cellules de l'immunité et une réactivité des cellules immunitaires résidentes. L'inflammation cérébrale a longtemps eu un rôle réduit aux mécanismes de réparation et de restauration de l'intégrité de la BHE dans les processus pathologiques cérébraux. Actuellement, de nombreux arguments sont en faveur de l'implication de la réaction inflammatoire dans le développement des lésions cérébrales post-traumatiques.

II.2.2-a) Barrière hémato-encéphalique et œdème cérébral

La définition historique de l'immuno-privilège du système nerveux central repose essentiellement sur l'absence de drainage lymphatique et la présence de la BHE, barrière anatomique et immunologique, qui joue le rôle de filtre sélectif essentiel à la stabilité de l'environnement cellulaire et au bon fonctionnement du système nerveux central. D'autres systèmes à l'interface entre, d'une part, le sang et le liquide céphalo-rachidien (LCR, barrière hémoméningée) et d'autre part le tissu nerveux et le LCR (barrière encéphaloméningée) participent aussi à la régulation de la circulation des fluides entre le cerveau et le sang. Cependant, la BHE est probablement la structure la plus importante dans la protection du cerveau contre les agressions.

Le traumatisme crânien entraîne une augmentation accrue et anormale de la perméabilité de la BHE, ceci par le biais de deux mécanismes complémentaires : l'atteinte physique de son intégrité provoquée par les dommages sur les cellules endothéliales et les astrocytes qui la composent, et les manifestations biochimiques inhérentes à l'inflammation locale.
En effet, la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-Iβ, le TNF-α et l'IL-6 augmente la perméabilité de la BHE.
Cette perméabilité se traduit par l'entrée passive des protéines sériques dans le compartiment intracérébral, conduisant à la formation de l'œdème vasogénique, une des premières manifestations de l'inflammation post-traumatique. Les cellules endothéliales lésées produisent très précocement différents médiateurs chimiques comme l'histamine, l'acide arachidonique, le NO• et la bradykinine. Ces molécules, de part leurs propriétés vasodilatatrices, contribuent à accroître les échanges vasculaires et à entretenir cet œdème.

II.2.2-b) Les médiateurs de l'inflammation

Les mécanismes de la phase d'amplification de la réaction inflammatoire mettent en jeu l'expression de différents médiateurs pro-inflammatoires de la famille des cytokines et chimiokines (TNF-α, TGF-β, IL-1, IL-6, IL-10, IL-8, …), le BDCF (brain-derived chemotactic factor), les molécules d'adhésion (ICAM et sélectine P,…) et les facteurs du complément. Leur expression est augmentée à la fois dans la circulation systémique et dans le parenchyme cérébral. Au niveau tissulaire, leurs sources potentielles sont à la fois les neurones et les cellules immunitaires résidentes, ainsi que les neutrophiles et les monocytes/macrophages de la périphérie qui, grâce à la rupture de la BHE, pénètrent le parenchyme cérébral et contribuent à augmenter le pool de production locale.
Dans les 24 heures qui suivent le traumatisme crânien, les molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules de l'endothélium et des leucocytes, ainsi que la synthèse locale de chimiokines permettent le recrutement de leucocytes circulants qui s'accumulent au sein du tissu cérébral lésé.
La réponse inflammatoire s'étend ensuite et devient massive entre trois et cinq jours, à cause des neutrophiles et monocytes recrutés, ainsi que des cellules résidentes activées (astrocytes et cellules de la microglie), qui induisent la production de radicaux libres et de cytokines pro-inflammatoires, et la libération de facteurs neurotoxiques qui induisent la mort neuronale tardive[81].

II.2.2-c) Rôle des cytokines dans l'inflammation aiguë et tardive

Les effets liés à l'inflammation post-traumatique sont en réalité très variables selon le degré de la réponse inflammatoire et le moment auquel elle se déroule. La réponse inflammatoire immédiate contribuerait à des effets post-traumatiques délétères, tandis que des phénomènes inflammatoires plus tardifs seraient réparateurs[78].
Cette dualité a été principalement mise en évidence par l'étude des principales cytokines produites lors d'un traumatisme crânien : l'IL-1β et le TNF-α. Ainsi, les effets délétères du TNF-α produit immédiatement après le traumatisme sont indéniables ; il endommage l'intégrité de la BHE[82], induit le

recrutement leucocytaire, et augmente la perméabilité vasculaire. De nombreuses études, utilisant des anti-TNF montrent ainsi ses effets délétères sur le volume de lésion, l'œdème cérébral, l'issue du traumatisme,…[83-85]. Cependant, des effets protecteurs du TNF ont aussi été montrés. Des souris invalidées pour le TNF-α montrent une réponse biphasique après un traumatisme, avec une meilleure récupération dans les deux premiers jours, suivi de problèmes neurologiques plus importants entre une et quatre semaines[86]. Ces résultats supportent la notion d'un effet toxique du TNF dans la phase précoce, mais un effet bénéfique à long terme dans la phase de réparation, d'où une fenêtre thérapeutique restreinte à considérer.

II.2.3 *Modes d'action actuels*

Il n'existe malheureusement pas de traitements efficaces pour lutter contre les effets des traumatismes crâniens. A l'heure actuelle, le mannitol et les barbituriques sont couramment employés. Les effets neuroprotecteurs de l'hypothermie chez l'homme sont discutés ; elle permettrait de contrôler la pression intracrânienne, et de diminuer les cascades biochimiques qui conduisent aux dommages secondaires[87,88]. Certains carabinoïdes sont actuellement à l'étude pour leur effet protecteur sur la mort neuronale tardive, grâce à l'inhibition de l'excitotoxicité, de la formation de radicaux libres, et de la neuroinflammation[89].
La difficulté d'obtenir des résultats intéressants est en partie liée aux problèmes de fenêtre thérapeutique, doses et modes d'administration au cerveau, qui sont délicats à déterminer à l'aide des modèles expérimentaux disponibles et compte tenu de la variété des traumatismes.

II.2.4 *Modèles expérimentaux*

La pertinence des modèles expérimentaux de traumatisme crânien est fréquemment discutée. Ces modèles ont été conçus de façon à reproduire les situations rencontrées en clinique humaine ; ils reposent donc sur des observations cliniques, anatomo-pathologiques et biochimiques. Les difficultés principales résident dans la conception même de ces modèles car le trauma est une pathologie extrêmement hétérogène, et dans le choix des paramètres de validation du modèle[90].
Les modèles sont généralement classés en fonction du mode d'induction du trauma, soit par déformation induite par un impact direct du cortex, du crâne, ou par application d'une ou plusieurs forces d'accélération en l'absence d'impact.

On distingue, parmi ces modèles :

- Les modèles expérimentaux réalisés à crâne ouvert : ils impliquent l'application directe d'un impact sur le cortex, et conduisent principalement à la formation d'une lésion focale corticale située au niveau de la zone d'impact. En fonction de la pression de percussion appliquée et de la zone percutée (centrale ou latérale), des lésions de degré de sévérités variables (trauma léger, modéré, ou sévère) sont alors observées.
- Les modèles expérimentaux réalisés à crâne fermé : ils résultent d'une percussion directe de la tête ou de la boîte crânienne ou encore d'un processus d'accélération/rotation. La percussion de la boîte crânienne produit une onde de choc qui se transmet au cerveau sous forme de contraintes de déformation (étirement, écrasement, torsion). Ces modèles provoquent des lésions diffuses de la substance blanche, et peuvent induire des lésions vasculaires hémorragiques et des lésions de contrecoup.
- Des modèles plus complexes associant des complications au choc traumatique (épisodes hypoxiques ischémiques, hypertension,…).

Il existe également des modèles *in vitro* qui permettent d'aborder par exemple les aspects biomécaniques ou électophysiologiques du trauma diffus à l'échelle du neurone.

	Modèle expérimental	Espèce animale	Induction du traumatisme
Modèle à crâne ouvert	Percussion de fluide	rongeur[91]	Pulsation de fluide sous pression à la surface de la dure mère
	CCI (controlled cortical impact)	furet[92] rat, souris[93,94]	Impacteur rigide sur la dure-mère induisant un choc qui se transmet au parenchyme adjacent
Modèle à crâne fermé	Impact d'accélération	rat[95]	Lâcher de poids de cuivre à travers un tube de plexiglas servant de guide
	CHI (closed head injury)	rat, souris[96,97]	Lâcher de poids qui coulisse le long de la tige de l'impacteur sur la tête de l'animal

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux modèles expérimentaux de traumatisme crânien.

II.3. Inflammation aiguë ou chronique : l'uvéite

II.3.1 *Présentation*

II.3.1-a) Définition

L'uvéite est une inflammation intra-oculaire touchant l'uvée.
L'uvée peut être divisée en trois parties qui sont, d'avant en arrière :

- Uvée antérieure : iris baignant dans l'humeur aqueuse, sépare la chambre antérieure de la chambre postérieure
- Uvée intermédiaire : corps ciliaire qui sécrète l'humeur aqueuse
- Uvée postérieure : la choroïde en rapport avec la rétine et la sclèrotique (sclère) ; elle constitue la membrane nourricière de l'œil par sa richesse vasculaire et nerveuse

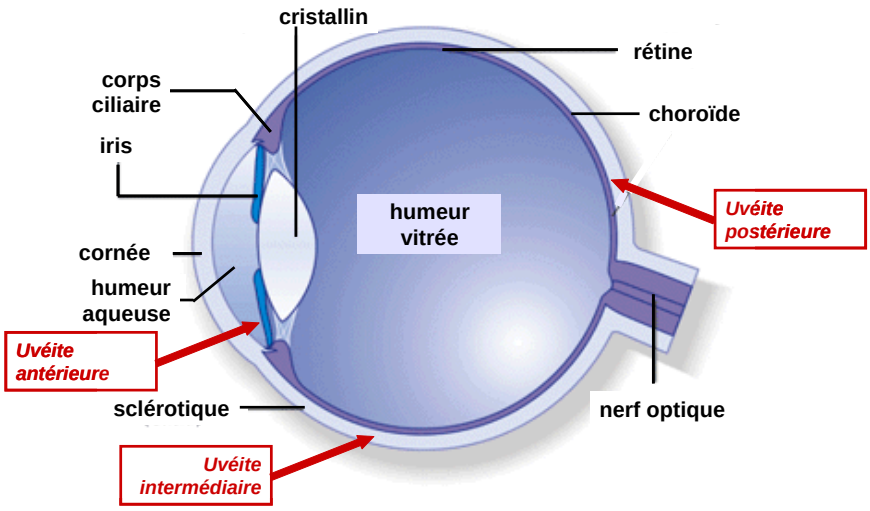


Figure 5 : coupe sagittale du globe oculaire et classification schématique des uvéites selon la zone touchée.

On peut ainsi définir une uvéite antérieure (iritis), intermédiaire, ou postérieure (choroïdite ou vitréite) ; une panuvéite associe une uvéite antérieure et postérieure. L'uvéite antérieure représente 70% des uvéites.
L'uvéite peut conduire à la formation d'un œdème, à de fortes pressions intra-oculaires, et même à la destruction des tissus oculaires et la cécité.
L'incidence annuelle de la maladie est de 38/100 000 en France, avec un maximum dans la tranche d'age 20-50 ans. Cette maladie est la cause de 10 à 15 % des cécités totales[98].

L'étiologie de la maladie est retrouvée dans environ 70% des cas[99]. Elle peut être associée à une condition infectieuse, à une maladie systémique, ou être une maladie oculaire spécifique. Quand l'uvéite n'est pas reconnue comme appartenant à l'une de ces trois catégories, on parle d'uvéite idiopathique. 35% des uvéites sont d'origine infectieuse, une majorité de celles-ci étant due à la toxoplasmose, qui est l'étiologie la plus fréquente de la maladie. 23% des uvéites sont d'origine systémique ; elles sont majoritairement liées à une sarcoïdose, à la maladie de Behçet, ou à des maladies rhumatismales. Dans les formes dites idiopathiques, aucune cause n'a pu être identifiée avec certitude.
Certaines uvéites ont une composante héréditaire, et les uvéites antérieures sont associées à l'HLA B27 dans 50% des cas. Les personnes ayant une maladie inflammatoire systémique ou de l'intestin ont également plus de risque de développer une uvéite antérieure.

II.3.1-b) Profil clinique

L'uvéite aiguë survient brutalement et persiste habituellement moins de six semaines. Si elle réapparaît, on parle d'uvéite aiguë récidivante.
L'uvéite peut aussi être chronique ; dans ce cas, l'inflammation dure plusieurs mois ou années. Sa survenue peut alors être asymptomatique, mais des épisodes aigus ou subaigus sont toujours possibles.

II.3.2 *Inflammation intra-oculaire*

L'œil, tout comme le cerveau, est immunoprivilégié. Les échanges entre l'œil et la circulation générale se font à travers deux barrières : la barrière hématorétinienne interne, composée de capillaires rétiniens, et la barrière hématorétinienne externe, composée de l'épithélium pigmenté à jonctions serrées.
Les mécanismes exacts du déclenchement et de la régulation de l'inflammation de l'œil sont mal connus. Les uvéites d'origine auto-immune ont une prévalence de 0,2 % dans les pays développés. Dans ce cas, des lymphocytes T CD4+ reconnaissent un auto-antigène rétinien, et induisent le recrutement de leucocytes dans l'œil, où le développement de la réaction inflammatoire conduit à la destruction des photorécepteurs et des cellules neuronales. Cette inflammation entraîne une baisse de la vision et peut conduire à la cécité. Du fait de l'immunoprivilège de l'œil, qui le protège de réactions immunes destructives intra-oculaires, il est supposé que l'initiation de la réaction immune est extérieure à l'œil, et est due à un mimétisme moléculaire de l'antigène avec des protéines oculaires[100]. Dans ces uvéites, le profil lymphocytaire est de type Th1[101].

L'uvéite antérieure aiguë, à laquelle nous nous sommes intéressés dans nos études, est d'étiologie inconnue. Bien que la plupart des patients ne présentent pas d'infection clinique, on suppose la présence d'une inflammation systémique pendant la phase aiguë de la maladie, et un rôle des réponses innée et adaptative dans le développement de la maladie.

Quelle que soit la nature de l'uvéite, l'importance des cytokines a été mise en évidence dans la maladie. Les principales cytokines mises en cause dans l'uvéite sont le TNF-α, l'IL-6, l'IL-1, et l'IFN-γ[102-105]. L'utilisation d'anti-cytokine ou de cytokine anti-inflammatoire s'est révélée intéressante pour lutter contre l'uvéite. Ainsi, l'IL-1Ra injecté en intravitréal permet de réduire considérablement l'infiltration cellulaire dans l'humeur aqueuse, et empêche la rupture de la barrière hématorétinienne, mais l'inflammation persiste[106]. De même, le traitement systémique par IL-10 permet la réduction de l'infiltration cellulaire, mais est sans effet sur l'exudation des protéines[107].
Il a été montré, dans un modèle expérimental aigu, qu'un des premiers signes d'inflammation est la production de NO• par la NOS inductible[108]. Cette activation de iNOS est ensuite maintenue par la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, les neutrophiles, et les cellules endothéliales. Les MMPs, principalement MMP-1, MMP-3, MMP-9 et TIMP-1, sont retrouvées à des taux élevés chez des patients atteints d'uvéite, et dans un modèle d'uvéite aiguë chez le lapin[109]. Une étude chez les patients atteints d'uvéite intermédiaire ou postérieure a récemment mis en évidence le rôle prépondérant de l'IL-6[110].

II.3.3 *Rôle majeur du TNF-α*

L'importance du TNF-α dans l'uvéite est mise en évidence par une augmentation systémique et locale du TNF-α dans les modèles animaux d'uvéite aiguë[104,111] ou auto-immune[112]. L'injection intra-oculaire de TNF-α chez le rat induit une uvéite aiguë qui ressemble à celle obtenue par induction au LPS[113]. Smith *et al* ont mis en évidence une importante réduction de l'inflammation intra-oculaire après administration de LPS chez des souris invalidés pour les récepteurs du TNF-α[114]. De même, dans un modèle d'uvéite auto-immune chez des souris déficientes pour les récepteurs du TNF-α ou du récepteur de type I de l'IL-1, la pathologie est moins sévère, avec une infiltration cellulaire et un taux d'IL-6 très réduits[115].

L'injection intravitréenne de TNF-α chez le lapin induit une vasodilatation, la rupture des barrières hématorétiniennes, l'infiltration de cellules inflammatoires, et l'accumulation de PGE2[116]. Le traitement par etanercept (hTNFR-IIs/hIgG1) dans un modèle aiguë d'uvéite met en évidence le rôle du TNF-α dans l'augmentation de l'infiltration leucocytaire et de la perméabilisation des barrières hématorétiniennes[117]. Dans un modèle auto-immun d'uvéite, la neutralisation du TNF-α par une protéine de fusion TNFR-Is/IgG permet de réduire l'état d'activation des macrophages infiltrés, qui produisent alors moins de NO•. Cette inhibition prévient l'apoptose des cellules rétiniennes et la dégradation des photorécepteurs[118]. Etant donné l'importance des lymphocytes T dans l'uvéite d'origine auto-immune, l'effet obtenu par inhibition du TNF-α à l'aide d'une protéine TNFR-Is/IgG1 a été étudié chez des patients atteints d'une inflammation intra-oculaire du segment postérieur (PSII)[119]. Ce traitement entraîne l'augmentation de production d'IL-10 par les LT, au détriment de l'IFN-γ ; ce changement s'accompagne d'une augmentation de l'acuité visuelle.

Cependant, plusieurs études montrent l'inefficacité de traitements anti-TNF à l'aide de pentoxifilline (inhibiteur de la transcription du TNF-α)[120] ou d'un anticorps anti-TNF dans un modèle animal d'uvéite aiguë[121]. Les différences observées peuvent être expliquées par un mode de traitement différent. Ainsi, le TNF-α est un médiateur précoce de l'inflammation intra-oculaire[103,111], et l'administration d'inhibiteur du TNF doit être précoce pour être efficace.

II.3.4 *Traitements actuels*

Les traitements actuels reposent sur un traitement local symptomatique à l'aide de corticoïdes, voire une corticothérapie générale si l'uvéite est sévère. Selon la cause de l'uvéite, et si elle est très sévère, d'autres immunosuppresseurs (cyclosporine, cyclophosphamide) peuvent être employés.
Les possibilités de traitement restent limitées du fait de la difficulté d'accès à l'œil. Ainsi, si l'instillation de collyres reste la méthode thérapeutique la plus employée, le développement de nouvelles technologies locales est en plein essor[122], principalement afin d'éviter les effets secondaires liés à l'utilisation des corticoïdes.

A l'heure actuelle, plusieurs études cliniques sont en cours par utilisation d'infliximab (anticorps anti-TNF-α) chez des patients atteints d'uvéite chronique antérieure et résistants aux immunomodulateurs classiques[123], ou chez des patients atteints d'uvéite antérieure réfractaire[124] ; ces études donnent des résultats encourageants et à long terme, sur plus de 6 mois. Par ailleurs, 17 patients atteints d'uvéite postérieure ont été traités par injections intraveineuse d'une protéine fusionnée TNFR-I/IgG, permettant la rémission pour 12 d'entre eux[125]. Dans cette étude, des effets secondaires d'infusion modérée (3 patients) ou de lymphocytopénie transitoire (2 patients) ont cependant été observés. L'etanercept a été utilisé chez des enfants atteints d'uvéite chronique et résistants aux traitements classiques[126] ; ce traitement a permis de réduire l'inflammation intra-oculaire dans 63% des cas, et d'améliorer l'acuité visuelle dans 40% des cas. Les résultats obtenus requièrent bien sûr des études plus approfondies, mais sont plutôt encourageants.

II.3.5 *Modèles expérimentaux*

Le modèle EIU (endotoxin-induced uveitis) que nous avons utilisé chez le rat est induit par injection de LPS dans la patte de l'animal. C'est un modèle d'uvéite antérieure aiguë, qui conduit à un pic d'inflammation 24 heures après injection de LPS, qui chute ensuite dans les 96 heures suivantes[127]. Ce modèle se caractérise par la rupture des barrières hématorétiniennes qui entraîne la percolation des protéines du sérum, par une infiltration de macrophages et de neutrophiles dans l'œil, et par un effet délétère sur les cellules rétiniennes pouvant conduire à leur mort. Le TNF-α joue un rôle majeur dans ce modèle expérimental ; en effet, le LPS active les monocytes via le TLR4, qui vont en réponse produire des cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF-α.
Un modèle similaire d'uvéite aiguë est utilisable chez la souris, après injection intravitréenne de LPS. Chez le lapin, l'inflammation est provoquée par injection intraveineuse de LPS dans l'oreille.

Le modèle classique d'uvéite auto-immune utilisé est l'uvéite auto-immune expérimentale (UAE) ; elle est induite chez le rat Lewis par immunisation à l'aide d'auto-antigènes spécifiques de la rétine comme le S-antigène ou l'IRBP (interphotoreceptor retinoid-binding protein), ou des peptides issus de ces protéines.
Chez le lapin, une uvéite auto-immune similaire est induite par immunisation sous-cutanée d'un antigène de *Micobacterium tuberculosis*, avec un rappel une semaine plus tard.

II.4. Maladie auto-immune : la polyarthrite rhumatoïde

II.4.1 *Présentation*

II.4.1-a) Définition

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques ; il aboutit à une destruction articulaire. Sa prévalence est de 0,3% de la population adulte. La PR atteint surtout les femmes (80%) et peut survenir à n'importe quel âge mais débute le plus souvent entre 35 et 55 ans. Elle représente un véritable problème de santé publique car 50% des malades ont arrêté leur activité professionnelle moins de cinq ans après son début et la durée de vie des patients est réduite en moyenne de cinq à dix ans[128]. La cause initiale de la maladie reste jusqu'à aujourd'hui inconnue.

II.4.1-b) Aspects cliniques

Les manifestations de la PR sont multiples. Elle se caractérise par une inflammation des articulations, avec une prédilection pour les mains, les poignets, les genoux et les pieds ; néanmoins, toutes les articulations peuvent être touchées. Les conséquences de l'inflammation de la membrane synoviale, qui entraîne une synovite chronique, se traduisent par la formation d'un tissu inflammatoire, le pannus, dont la chronicité entraîne la destruction du cartilage et de l'os. L'inflammation de la synoviale provoque des douleurs diurnes et nocturnes, un gonflement des articulations, une raideur, et limite la mobilité des patients. La destruction du cartilage, l'érosion osseuse et la déformation des articulations qui en résultent sont les caractéristiques de la maladie. Des manifestations extra-articulaires peuvent survenir, les plus connues étant la présence de nodules rhumatoïdes, typiquement trouvés au niveau des zones de pression du tissu sous-cutané entourant l'os, mais pouvant aussi être observés au niveau des tendons, du myocarde ou des poumons. D'autres atteintes extra-articulaires sont possibles : musculaire (myosite), oculaire (sclérite), cardiaque (péricardite).

L'évolution de la maladie est variable en fonction des individus, et souvent lente :

- 2/3 des patients présentent une évolution polycyclique dans laquelle la maladie ne disparaît jamais totalement mais fait alterner des phases de poussées et de rémissions sans progression en terme de sévérité.
- D'autres patients montrent une évolution monocyclique au cours de laquelle, après une période de douleurs et un gonflement, les symptômes articulaires disparaissent entièrement. La maladie peut alors réapparaître des mois ou des années plus tard.
- Environ 10% des cas développent une forme agressive de la maladie aboutissant à la destruction progressive des articulations et impliquant de plus en plus d'articulations.

II.4.1-c) Facteurs influençant la PR

L'origine précise de la PR n'est pas connue. Cependant, on la classe comme une maladie auto-immune à cause de la présence d'effecteurs auto-immuns (activation de lymphocytes T et B, présence d'auto-anticorps, association aux gènes HLA).
La maladie semble résulter d'interactions entre facteurs endogènes (génétiques et hormonaux) et environnementaux (infectieux). Plusieurs facteurs favorisant la PR ont été identifiés[129] :

- **Hormonaux** : la maladie est quatre fois plus fréquente chez la femme, et il existe une rémission quasi constante de la maladie au cours de la grossesse[130]. Au cours du mois qui suit l'accouchement, les symptômes réapparaissent généralement, soit de façon insidieuse, soit brutalement.

- **Génétiques** : la PR n'est pas une maladie strictement héréditaire mais il est possible d'observer plusieurs cas dans une même famille. Il existe en effet des facteurs de prédisposition génétique. L'étude des antigènes HLA montre qu'il existe une liaison incomplète avec les gènes HLA DR4 mais uniquement pour certains sous-types DR4 (DRB1 0401, 0404, 0405) et DR1 (DRB1 0101), présents respectivement dans 60 et 38% des cas[131].
- **Environnementaux** : on suspecte sans pouvoir l'affirmer l'intervention d'agents infectieux bactériens (protéine de choc thermique de mycobactéries) ou viraux (rétrovirus, parvovirus)[132,133]. La PR n'est pas une maladie infectieuse mais certaines infections, respiratoires en particulier, semblent susceptibles d'exacerber les symptômes. Le rôle des infections virales est également évoqué dans le déclenchement ou le maintien des désordres immunologiques. En effet, le rôle du virus d'Epstein Barr, agent responsable de la mononucléose infectieuse, est évoqué depuis longtemps[134,135].

II.4.2 *Déroulement de la maladie*[26,136]

II.4.2-a) Facteurs déclenchant la maladie

L'infiltration de la membrane synoviale par des lymphocytes et des monocytes dans les zones périvasculaires lui confère un aspect d'organe lymphoïde secondaire[137] au sein duquel une stimulation antigénique pourrait amorcer ou entretenir un processus auto-immun. En effet, le rôle des LT dans la PR est suggéré par leur abondance dans le tissu synovial (ils représentent 30% de l'infiltrat) et l'effet bénéfique de traitements dirigés contre eux.
La cause initiale de la réaction inflammatoire reste indéterminée, mais l'importance du CMH II et les lymphocytes T CD4+ dans la maladie suggèrent l'existence d'un antigène arthritogénique non identifié. Cet antigène pourrait être viral (issu de l'EBV[134]) ou bactérien (issu d'*Escherichia coli*[138]). Il pourrait être une molécule de l'organisme reconnue comme antigène à cause d'un mimétisme moléculaire avec une molécule étrangère. La maladie pourrait aussi être liée à l'action cytotoxique de cellules T contre des cellules présentant un auto-antigène. Récemment, des antigènes endogènes possibles ont été identifiés, comme la glycoprotéine 39 du cartilage humain, les protéines citrullinées,…[136].

II.4.2-b) Médiateurs cellulaires impliqués

Le cartilage recouvrant les extrémités osseuses est constitué principalement de fibres de collagène (principalement de type II, mais aussi de collagènes mineurs tels que le type IX, X et XI) ainsi que de protéoglycanes produits par les chondrocytes. La membrane synoviale, constituée de synoviocytes de type macrophagiques (type A) et fibroblastiques (type B), entoure les structures articulaires à l'exception du cartilage. Celle-ci a pour rôle la protection du liquide synovial, lubrifiant l'articulation, et l'épuration des débris s'accumulant dans l'articulation.
Au cours de la PR, la membrane synoviale est fortement hypertrophique et envahit la cavité articulaire. En effet, il se produit une prolifération anormale des synoviocytes. Cette hyperplasie s'accompagne d'une intensification de la néo-angiogénèse et d'une forte infiltration cellulaire à prédominance lymphocytaire[139]. Outre les LT, on observe des LB souvent différenciés en plasmocytes ainsi que de nombreux monocytes[140]. Dans le liquide synovial, ce sont les polynucléaires neutrophiles qui prédominent[141].
L'érosion précoce du cartilage est liée à la formation et à ce développement du pannus. L'interface entre le pannus et le cartilage est en effet formée de macrophages et de fibroblastes activés exprimant des MMPs.

Les cellules T activées de la synoviale rhumatoïde peuvent activer ou maintenir l'activation des macrophages et des fibroblastes par le biais de facteurs solubles comme l'IL-15, l'IL-17[142] ou l'IFN-γ, ou encore par la production de chimiokines qui participeraient au recrutement de nouvelles cellules,

notamment des PN. Ces cellules activées produisent du TNF-α, de l'IL-1, de l'IL-6, des MMPs, et des radicaux libres. Ces cytokines sont les médiateurs clefs qui entraînent le développement de l'inflammation.
La membrane synoviale et les LT du liquide synovial de patients atteints de PR contiennent de façon prédominante les ARNm de l'IFN-γ tandis que les ARNm de l'IL-4 sont rarement exprimés[143] ; de même, des clones T isolés de la membrane synoviale rhumatoïde expriment un profil de cytokines qui correspond au profil Th1[144]. Ces observations suggèrent que les cytokines Th2 produites par les LT CD4+ sont peu abondantes dans les articulations rhumatoïdes, et que les cellules CD4+ Th1 prédominent.

Les cellules T activent aussi les lymphocytes B. En effet, les amas lymphocytaires de la membrane synoviale rhumatoïde contiennent des LB dont une majorité sont différenciés en plasmocytes produisant majoritairement des auto-anticorps, les principaux étant les facteurs rhumatoïdes IgG, IgA ou IgM présents dans le sérum de 80% des patients. Leur fonction exacte n'est pas bien connue mais on pense que les LB les exprimant à leur surface seraient des CPA beaucoup plus efficaces que les LB classiques. En effet, ils présenteraient des antigènes dont ils ne sont pas spécifiques en internalisant des complexes immuns fixés par les fragments Fc des immunoglobulines[145]. D'autres auto-anticorps sont présents dans le liquide synovial des patients polyarthritiques, notamment des anticorps anti-nucléaires, anti-collagène[146], ou anti-filagrine[147], mais aucune corrélation entre la présence de ces auto-anticorps et l'évolutivité du rhumatisme inflammatoire n'a pu être établie.

Les lymphocytes T expriment aussi RANKL qui stimule l'ostéoclastogénèse, et donc la destruction osseuse.
Les macrophages, lymphocytes et fibroblastes activés stimulent l'angiogénèse, ce qui permet la croissance et l'entretien du pannus en favorisant l'apport de cellules inflammatoires dans le tissu synovial.

II.4.2-c) Médiateurs solubles impliqués

Outre les cytokines, qui jouent un rôle central dans la PR que nous développerons ultérieurement, de nombreux médiateurs sont mis en jeu.
Tout d'abord, comme dans tout processus inflammatoire, des molécules d'adhésions (ICAM-1, VCAM-1,…) sont exprimées à la surface des cellules endothéliales, permettant un recrutement intense des leucocytes circulants. Les chimiokines IL-8 et MCP-1, sécrétées par les macrophages, favorisent aussi la migration vers le site inflammatoire.
La destruction du cartilage et de l'os sous-jacent est majoritairement due à l'activité d'enzymes protéolytiques telles que les sérines protéases et les métalloprotéases (collagénases, stromélysines, gélatinases) produites par les synoviocytes et les macrophages activés en réponse à des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et le TNF-α[148]. Les sérines protéases et les métalloprotéases digèrent successivement les protéoglycanes de la matrice extracellulaire et les fibres de collagènes[149].

La phospholipase A2 (PLA2) produite par les macrophages est une enzyme clef, car elle produit le précurseur des médiateurs primaires, l'acide arachidonique. Ce précurseur est à son tour métabolisé par les cyclo-oxygénases (COX) en prostaglandines qui possèdent principalement une activité de vasodilatation et de perméabilisation vasculaire, ainsi que la capacité d'induire la résorption osseuse. Les lipo-oxygénases transforment l'acide arachidonique en leukotriènes tels que les leukotriènes B4 et D4 qui possèdent des propriétés chimiotactiques et de perméabilisation vasculaire, respectivement. Les synoviocytes sont aussi capables de produire de la PGE2, de l'acide arachidonique, et des MMPs[150].

Les monocytes et PN peuvent produire des réactifs dérivés de l'oxygène très nocifs comme le peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres O_2•, OH•, et NO•. Les synoviocytes, macrophages et chondrocytes produisent de la NOS inductible et constituent ainsi une source de dérivés nitrés toxiques pour les tissus articulaires[59].

Le VEGF, facteur pro-angiogénique, joue un rôle fondamental dans l'angiogénèse, un mécanisme participant à l'initiation et à l'entretien de la synovite rhumatoïde[151].
Les fibroblastes et LT activés produisent RANKL, qui interagit avec RANK sur les ostéoclastes et permet l'activation de ces cellules, ce qui favorise la destruction osseuse[152].

II.4.3 *Importance des cytokines*

L'analyse des concentrations de cytokines et de l'expression de leur ARNm dans la PR et ses modèles expérimentaux suggère un déséquilibre entre la production de cytokines pro-inflammatoires et de cytokines anti-inflammatoires. Plusieurs études montrent que les cytokines qui contribuent à l'initiation et à l'entretien de la réponse inflammatoire (principalement le TNF-α et l'IL-1) sont surexprimées dans les articulations de patients atteints de PR, alors que l'IL-4 n'y est pas détectable[153,154]. Par ailleurs, les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-1Ra ou les récepteurs solubles du TNF ne sont pas présentes en quantités suffisantes pour neutraliser l'action de l'IL-1 et du TNF[47].
La production de cytokines dans les ganglions a été étudiée dans un modèle expérimental de PR[155]; les cytokines Th2 IL-4 et IL-10 ne sont produites ni pendant la phase d'induction de la maladie, ni à l'apparition des signes cliniques, alors qu'elles sont détectées pendant la phase de rémission. L'IFN-γ est en revanche produit très précocement, puis la synthèse de cette cytokine régresse jusqu'à la fin de la maladie et atteint un taux comparable à celui des souris naïves. Ce déséquilibre entre cytokines Th1 et Th2 joue un rôle très important dans la pathologie de la PR.

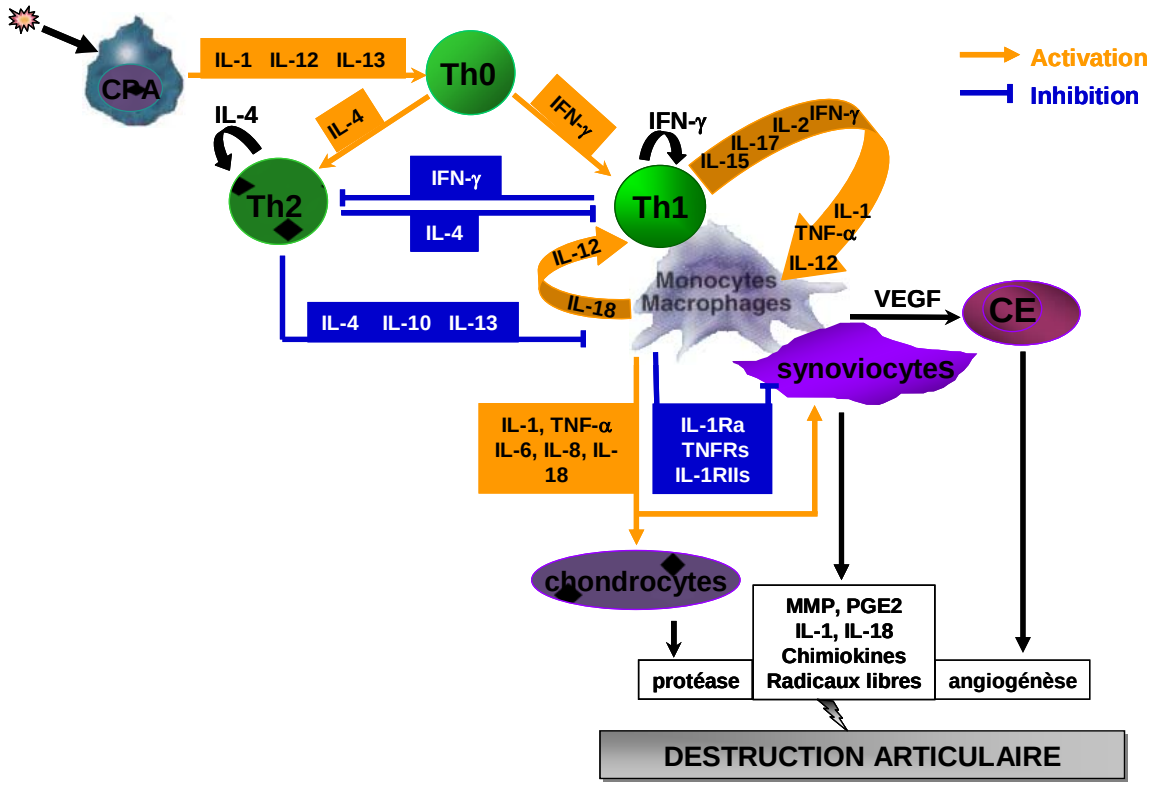


Figure 6 : Réseau des cytokines dans la polyarthrite rhumatoïde.
CPA : cellule présentatrice de l'antigène ; Th : lymphocyte T helper ; CE : cellule endothéliale.

II.4.4 *Rôle fondamental du TNF-α*

Le rôle du TNF-α dans la PR et dans les modèles expérimentaux est largement documenté.
Le rôle central de cette cytokine dans la maladie a été démontré notamment grâce à des analyses immunohistologiques sur des biopsies de patients arthritiques indiquant que le TNF-α et ses deux récepteurs sont présents dans la membrane synoviale, et dans la zone de jonction entre le pannus et le cartilage, à l'endroit de la destruction articulaire[156].
L'étude de souris transgéniques, établies par Keffer *et al* en 1991, montre aussi l'importance du TNF[157]. Ces souris expriment le gène du TNF-α humain dont la région 3', essentielle dans la régulation de la stabilité et de la traductibilité des ARNm, a été remplacée par celle du gène de la β-globine humaine. Cette modification est responsable d'une dérégulation de l'expression des ARNm du transgène. Dans ces conditions, ceux-ci ont une stabilité accrue après leur transcription et les souris développent une polyarthrite caractérisée histologiquement pas une hyperprolifération de la membrane synoviale, une intense infiltration de lymphocytes et de polynucléaires et une destruction du cartilage et de l'os.
De même, des souris déficientes pour le TNFR-I soumises à un modèle expérimental d'arthrite présentent une forme moins sévère de la maladie et une incidence plus faible[158]. Cette étude met en évidence le rôle fondamental du TNFR-I dans l'initiation de la maladie.
Par ailleurs, dans des modèles expérimentaux, l'utilisation d'anticorps anti-TNF ou de récepteurs solubles du TNF empêchent le développement de la maladie[159,160].

II.4.5 *Traitements actuels*

II.4.5-a) Approche classique

Les causes de la PR demeurant inconnues, les traitements actuels sont principalement symptomatiques, d'action rapide, agissant sur les signes de la maladie comme la douleur. Ils comprennent les antalgiques, les anti-inflammatoires non stéroïdiens qui sont efficaces mais présentent des effets secondaires importants, notamment une toxicité digestive et rénale, et les corticoïdes avec aussi des effets indésirables d'ordre osseux, cutanés, métaboliques.
Pour réduire la fréquence et l'intensité des crises mais également pour freiner l'évolution de la maladie, des traitements de fond, à action prolongée, sont utilisés. Les plus classiques sont les sels d'or, les antipaludéens, la salzopyrine et les dérivés thiolés. Le plus intéressant reste le méthotrexate qui bloque la prolifération cellulaire et l'inflammation, et permet ainsi un réel ralentissement dans la progression de la destruction articulaire. Le léflunomide, un immunomodulateur développé récemment, est le plus souvent utilisé lorsque le méthotrexate est inefficace[161].
Cependant, tous ces produits ne sont pas sans toxicité, ils nécessitent un suivi régulier des patients, et surtout, ils ne permettent pas de traiter tous les patients de manière efficace.

II.4.5-b) Utilisation thérapeutique des cytokines

La PR étant caractérisée par un déséquilibre de production de cytokines, l'utilisation même de ces médiateurs semble une méthode de choix pour remédier à la maladie.
La neutralisation des cytokines pro-inflammatoires doit permettre de rétablir l'équilibre avec les cytokines anti-inflammatoires. Ainsi, quatre de ces agents biologiques ont reçu l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la PR. L'infliximab, l'etanercept et l'adalimumab inhibent l'action du TNF, tandis que l'anakinra bloque l'IL-1. Ces nouvelles approches se révèlent très efficaces pour soulager le patient et permettent un ralentissement de la progression de la destruction ostéocartilagineuse.

D'autres traitements font actuellement l'objet d'essais cliniques. Des antagonistes de l'IL-6 (tacrolimus, rituximab), des molécules bloquant les voies de costimulation des lymphocytes T (CTLA-4-Ig)[162], et de nombreuses autres molécules candidates sont à l'études (elles sont détaillées dans la revue de Smolen et Steiner[163]).

II.4.6 *Modèles expérimentaux*

L'étude des modèles animaux d'arthrites expérimentales tient une place importante dans la compréhension de la maladie. La reproduction expérimentale de la PR présente un triple intérêt : d'une part, elle permet une étude standardisée des mécanismes potentiels de la maladie humaine ; elle offre, d'autre part, des moyens de criblage de médicaments ; enfin, elle permet d'explorer des approches thérapeutiques nouvelles.
Les modèles animaux d'arthrite peuvent être spontanés, et liés au seul fond génétique des animaux prédisposés (soit naturel, soit transgénique), ou induits par des agents non spécifiques, spécifiques ou infectieux (Tableau 2).

II.4.7 *Arthrite expérimentale au collagène*

II.4.7-a) Présentation du modèle

La première description de l'AEC a été faite en 1977 chez le rat par Trentham[164]. Trois ans plus tard, Courtenay a montré que l'AEC était également inductible chez la souris, et plus récemment, des arthrites expérimentales au collagène de type II (CII) chez les primates ont été décrites[165]. L'antigène inducteur de la pathologie articulaire est le CII qui peut être d'origine hétérologue (bœuf, poulet, homme) ou homologue chez le rat[164] ou la souris[166], le CII étant une molécule très conservée entre les espèces.
Les études les plus nombreuses utilisant ce modèle ont été effectuées chez la souris. Le protocole standard d'induction de l'AEC consiste en l'injection sous-cutanée de 50µg de CII bovin natif émulsionné dans de l'adjuvant complet de Freund suivie d'un rappel au 21ème jour par injection sous-cutanée de CII en adjuvant incomplet de Freund. La date d'apparition des premiers signes cliniques de la maladie se situe entre le 25ème et le 40ème jour après l'immunisation, affectant entre 80 et 100% des animaux injectés. La maladie débute par une inflammation croissante touchant les quatre pattes et, plus rarement, la queue. Après une phase inflammatoire intense, la pathologie articulaire régresse progressivement pendant plusieurs semaines. Ce modèle permet un suivi clinique de la maladie tout au long de son évolution, ainsi que des analyses histologiques au sacrifice.

II.4.7-b) Facteurs influençant l'AEC

- **Facteurs environnementaux et hormonaux** : les souris mâles sont plus sensibles que les femelles à l'AEC. Ceci est en partie expliqué par le rôle protecteur des oestrogènes[167,168]. Au contraire, chez les rats et les primates, les femelles sont plus susceptibles que les mâles[169]. Un autre facteur à prendre en compte est l'âge des animaux ; les souris ne sont sensibles à l'AEC qu'à partir de 6-7 semaines, la raison n'en étant pas élucidée.
- **Contrôle génétique** : il y a une grande variabilité dans la sensibilité à l'AEC parmi les souches de souris. Comme c'est le cas pour la PR et d'autres maladies auto-immunes, il y a une influence majeure de la région CMH. Wooley *et al*[170] ont découvert que seules quelques souches de souris sont sensibles à l'AEC. Les haplotypes les plus sensibles après immunisation au CII hétérologue sont les haplotypes H-2^{r} et H-2^{q}.
- **Reconnaissance du CII par les LT** : l'activation des LT spécifiques du CII nécessite une dégradation des molécules de collagène glycosylées en peptides et leur présentation par les

cellules présentatrices de l'antigène. Ces cellules ne sont pas identifiées, et il apparaît que celles-ci ne soient pas les cellules dendritiques[171] puisqu'elles présentent très faiblement le collagène.

D'autres cellules comme les macrophages sont probablement d'une grande importance pour présenter le CII aux LT autoréactifs.

II.4.7-c) L'AEC comme modèle de la PR

Le modèle d'arthrite expérimentale au collagène est le modèle le plus utilisé dans les études d'immunothérapie, de par ses similitudes pathologiques et immunologiques avec la polyarthrite chez l'homme.
Ainsi, dans les deux cas, les atteintes inflammatoires sont poly-articulaires. Les examens histologiques et radiologiques révèlent la formation d'un pannus accompagné d'une hyperplasie synoviale présentant un infiltrat de cellules polymorphes et à terme la destruction du cartilage et de l'os. Trois phases ont pu être définies dans le processus d'installation de la maladie : infiltration de cellules T et apparition de cellules macrophagiques exprimant le CMH-II, infiltration de granulocytes et formation d'un oedème et enfin formation du pannus contenant des macrophages, des granulocytes, des lymphocytes T et des cellules dendritiques activées[172].
Comme la PR, l'AEC requière les LT et les LB afin de se développer, c'est un modèle à immunité humorale et cellulaire.
La susceptibilité aux deux maladies est liée aux gènes du CMH II, suggérant des mécanismes immunologiques communs[173].

Cependant, d'autres paramètres diffèrent de la PR. Ce modèle est un état induit et par conséquent n'a pas lieu spontanément, comme chez l'homme. Il manque aussi des manifestations extra-articulaires de la PR humaine, incluant des nodules sous-cutanés et une fibrose pulmonaire. La place du CII chez l'homme n'est pas reconnue comme antigène déclenchant la maladie, toutefois, cette molécule peut avoir un rôle dans l'entretien de la maladie.

	Modèle expérimental	Espèce animale	Agent inducteur	Délai d'apparition de la maladie	Atteintes articulaires		Immunopathologie				Références
					Hyperplasie de la synoviale	Destruction articulaire	Réponse T	Autres cellules	humorale	FR	
Arthrites spontanées	MRL-lpr/lpr	souris MRL lpr/lpr (déficience du gène Fas)	/	6ème semaine de vie (+ syndrome lupique)	+	+	+	/	+	+	Hang (1982)
	KRN/NOD	souris NOD (tg pour le TCR spécifique de la RNase bovine)	/	25 à 35 jours	+	+	+	PN ; Mp	+	-	Matsumoto (1999)[174]
	Tg TNF	souris transgéniques pour le gène humain du TNF-α	/	Dans les 15 premiers jours	+	+	-	/	-	-	Keffer (1991)[157]
	Tg Tax HTLV-1	souris (expression du gène Tax du virus de type I de la leucémie humaine (HTLV-1))	/	2 à 3 mois	+	+	-	/	-	-	Saggioro (1997)[87]
	KO IL-1 Ra	souris (déficience du gène IL-1Ra)	/	5ème semaine	+	+	+	PN	+	+	Horai (2000)[175]
	ZAP-70	souris (mutation ponctuelle dans le gène de la zeta-chain-associated protein of 70 KD)	/	2 mois	+	+	+		+	+	Sakaguchi (2003)
Arthrites induites par un agent infectieux	Arthrite à paroi de streptocoque	rat ; lapin	Paroi de streptocoques	1 semaine	+	+	+	PN ; Mp	+	+	Cromartie (1977)[176]
	Arthrite virale	chèvre	Virus de l'encéphalite et arthrite caprine (CAEV)	2 semaines	+	+	+	Mp	+		Adams (1980)[177]
Arthrites immunes : agent inducteur non spécifique	Arthrite à adjuvant	rat	*Mycobacter. tuberculosis* + AIF	10 à 14 jours	+	+	+	/	+	-	Pearson (1956)[178]
	Arthrite au pristane	rat ; souris	pristane	2 mois	+	±	+	PN ; Mp	+	+	Potter (1981)[179]
	Arthrite induite par un antigène	lapin ; souris ; rat	Antigène soluble (fibrine, BSA)	3 semaines	++		++	PN ; Mp	+	+	Dumonde (1962)[180]
Arthrites immunes : agent inducteur spécifique	Arthrite induite par les protéoglycanes	souris	PG	7 semaines	+	+	+	Mp	+	±	Glantt (1987)[181]
	Arthrite expérimentale au collagène	souris ; rat ; primate	CII/ACF	4 semaines	+	+	+	PN ; Mo/Mp	+	+	Tentham (1977)[164] Courtenay(1980)[182] Cathcart (1986)[165]

Tableau 2 : Caractéristiques des principaux modèles expérimentaux de polyarthrite rhumatoïde.
PN : polynucléaire neutrophile ; Mp : macrophage ; Mo : monocyte ; tg : transgénique

III. Thérapies protéiques et chimiques anti-TNF-α

L'inhibition du TNF-α peut être réalisée à l'aide d'agents biologiques (anticorps, récepteurs solubles), ou non biologiques. Le développement des agents synthétiques est en plein développement, leurs intérêts majeurs étant un coût nettement plus faible que les agents biologiques, et une possible administration par voie orale. Dans ce contexte, l'inhibition du TNF-α à toutes les étapes, depuis sa synthèse jusqu'à son activité biologique a été envisagée.

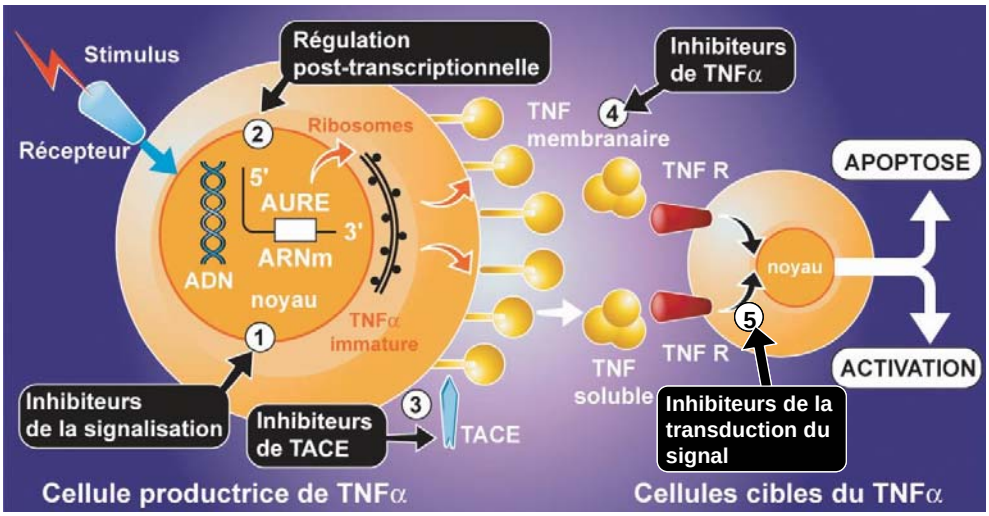


Figure 7 : Les différentes stratégies anti-TNF (d'après Wyeth).

III.1. Inhibiteurs de la signalisation régulant la synthèse de TNF-α

Cette voie d'études, très porteuse, présente néanmoins l'inconvénient que ces inhibiteurs ne seront jamais spécifiques à 100% d'une unique voie de transduction, et donc du TNF-α uniquement. Le champ des effets indésirables doit donc être étudié avec soin.

III.1.1 *Voie des MAPK :*

Les inhibiteurs peuvent agir sur les voies impliquées dans la régulation des gènes Fos et Jun formant AP-1 :

- **Un inhibiteur spécifique de JNK**, bloquant le domaine catalytique a été identifié ; il entraîne une réduction de la production de TNF-α, de MMPs, de COX-2, d'IL-2 et d'IFN-γ. Il semble efficace dans des modèles d'arthrites et de maladies inflammatoires digestives, mais également dans les complications vasculaires (infarctus, ischémie), et la maladie de Parkinson[183].
- **De nombreux inhibiteurs de p38** ont été étudiés[184]. La plupart sont des pyridinyl imidazolés qui bloquent le site de liaison de l'enzyme avec l'ATP. Ils sont aussi capables d'inhiber la transcription de différentes protéines et d'agir sur les séquences AURE binding proteins.

III.1.2 *Voie NF-κB :*

Il existe dans cette voie de nombreuses cibles thérapeutiques, mais qui sont loin d'être spécifiques car plus de 70 gènes interviennent dans l'inflammation sous la dépendance de NF-κB[185].

- **Inhibiteurs du protéasome** : ils agissent en empêchant la libération de NF-κB par IκB ; ils bloquent aussi le cycle cellulaire et induisent l'apoptose.
- **Antioxydants** : la production de radicaux libres étant capable d'activer NF-κB, les molécules anti-oxydantes modulent l'activation de NF-κB, mais agissent aussi sur le facteur AP-1.

- **Inhibiteurs de la kinase I-κB** : ils agissent sur le site ATP de phosphorylation de cette kinase. Ils sont capables de réduire la production de TNF-α de 85% par des macrophages de rats stimulés au LPS.

Si ces molécules possèdent une certaine spécificité, leur mode d'action est commun à des molécules plus connues comme les corticoïdes, la mésalamine et la cyclosporine, qui sont aussi capables de réduire la synthèse du TNF-α en agissant sur les voies des MAPK et de NF-κB.

III.1.3 *Inhibiteurs de la transcription par modification de la concentration cellulaire en AMPc*

Toutes les molécules qui peuvent augmenter la concentration cellulaire en AMPc sont capables d'inhiber la synthèse de TNF[186]. On peut citer :

- **Inhibiteurs de phophodiesterase de type IV** (enzyme de dégradation de l'AMPc), comme la pentoxifylline ou le rolipram.
- **Prostanoïdes**, comme la PGE2 et la prostacycline.
- **Immunoglobulines intraveineuses polyvalentes** : les IgIV.

III.2. Régulateurs des mécanismes post-transcriptionnels de l'ARN du TNF-α

III.2.1 *Régulation des protéines AUBP*

Cette voie devrait être prometteuse, car c'est une étape clef de la régulation de production du TNF.
Par exemple, les souris invalidées pour le gène TIA-1 produisent plus de TNF-α que des souris stimulées au LPS[187]. De part son rôle fondamental dans la transcription du TNF-α, et sa spécificité d'action (d'après les connaissances actuelles), TIA-1 pourrait être une cible intéressante.

III.2.2 *Action sur la région 3' non transcrite de l'ARNm du TNF-α*

L'équipe de Lyer, travaillant sur des peptides dérivés de la chaîne lourde des protéines HLA de classe I, a récemment montré l'efficacité d'un de ces peptides qui inhibe la production de TNF-α en réponse au LPS ou à la concanavaline A *in vitro* et *in vivo*, mais qui est sans effet sur l'expression d'IL-1. Cette équipe a montré que le peptide interagissait avec des séquences de l'ARNm du TNF-α appartenant à la région 3' non transcrite, mais différentes des séquences AURE[188].

III.2.3 *Thalidomide*

La thalidomide semble agir en stabilisant l'ARNm du TNF-α, vraisemblablement en bloquant la voie de p38. Cependant, chez l'homme, l'efficacité de cette molécule est contrebalancée par ses effets indésirables (somnolence, neuropathie, effets tératogènes), d'où la recherche d'analogues mieux supportés. Ces études ont permis de détecter deux types d'inhibiteurs[189,190]:

- **Les sels CIDs** (selective cytokine inhibitory drugs) qui sont comme la thalidomide des inhibiteurs de la phosphodiesterase IV. Ces molécules bloquent la synthèse du TNF-α, et de façon plus modérée celle de l'IL-1β. Elles augmentent faiblement la synthèse d'IL-10 et n'ont pas d'action sur les cytokines lymphocytaires.

- **Les IMIDs** (immunomodulatory drugs) sont des molécules dont le mode d'action est inconnu, mais qui n'inhibent pas la phosphodiesterase de type IV. Ces molécules diminuent de façon très importante la synthèse de TNF (2000 fois plus que le thalidomide), et celle de l'IL-1β et de l'IL-6. Elles augmentent aussi la synthèse de l'IL-10 et des cytokines lymphocytaires (IL-2, IFN-γ).

III.3. Inhibiteurs de la libération membranaire du TNF-α

Des inhibiteurs de la TACE ont montré leur intérêt dans des modèles d'inflammation et d'arthrite expérimentale, mais ils peuvent aussi inhiber la libération d'autres molécules comme les TNFRs, et leur utilisation doit donc être réalisée avec prudence[191].

III.4. Modulateurs de l'activité biologique du TNF-α : anticorps, récepteurs solubles et dérivés

De manière anecdotique, la suramine, un dérivé de l'urée, peut être utilisée pour inhiber le TNF-α. En effet, ce composé favorise la dissociation du TNF-α soluble trimérique en ses sous-unités biologiquement inactives[192]. Cependant, ce composé ne semble pas faire l'objet d'études en vue d'une utilisation médicale.

La majorité de ces modulateurs dérivent des anticorps anti-TNF ou des récepteurs solubles du TNF qui, dans les deux cas, bloquent l'activité du TNF en se liant à celui-ci, le complexe formé étant dégradé.

Cette approche est la voie largement dominante ; elle a déjà donné lieu à la commercialisation de deux molécules : l'infliximab (Remicade™) et l'etanercept (Enbrel™) utilisées dans la PR et la maladie de Crohn, de nombreux essais cliniques sont par ailleurs en cours[193]. En 2001, plus de 150 000 patients atteints de PR étaient traités par un anti-TNF[194].

	Description	Cible de liaison	Avidité (Ka)	Masse moléculaire (kD)	½ vie sérique (jours)	Dose/fréquence d'administration	Voie d'administration
Infliximab	Anticorps IgG1 chimérique 75%homme-25%souris	TNF-α membranaire et soluble	$1,8.10^9$ M^{-1}	149	9	3-10mg/kg toutes les 4-8 semaines + MTX	i.v
Adalimumab (D2E7)	Anticorps IgG1 humain	TNF-α membranaire et soluble	~ $1,8.10^9$ M^{-1}	150	10	40mg tous les 15 jours	s.c/i.v
CDP870	Fragment Fab' anticorps humain + PEG	TNF-α membranaire et soluble	~ $1,8.10^9$ M^{-1}		14	400mg toutes les 4 semaines	s.c
Etanercept	hTNFR-IIs / hIgG1	TNF-α membranaire et soluble ; TNF-β	10^{10} M^{-1}	150	4,8	25mg ; 2X/semaine	s.c
Lenercept	hTNFR-Is / hIgG1	TNF-α membranaire et soluble ; TNF-β	10^{10} M^{-1}	120	~ 5	0.5mg/kg toutes les 4 semaines	i.v
PEG monomère	TNFR-Is + PEG	TNF-α membranaire et soluble ; TNF-β	2.10^6 M^{-1}	42	1	0,6mg/kg toutes les semaines	s.c
PEG dimère	TNFR-Is + PEG	TNF-α membranaire et soluble ; TNF-β	~ 10^9 M^{-1}	55	1	0,3mg/kg toutes les 3 semaines	s.c/i.v
Onercept	hTNFR-Is	TNF-α membranaire et soluble ; TNF-β	2.10^6 M^{-1}	20	15 heures	50mg ; tous les 2 jours	s.c

Tableau 3 : Données caractéristiques des différents anti-TNF utilisés actuellement ou à l'étude. La dose et la voie d'administration concernent le traitement de la PR ou de la maladie de Crohn.

III.4.1 *Les anticorps anti-TNF-α*

Cette approche est non physiologique, car il n'existe pas d'anticorps naturels anti-TNF-α connus actuellement.
Trois principaux anticorps anti-TNF sont à l'étude actuellement :

- **Infliximab** : anticorps chimérique comportant les parties constantes de l'IgG1 humaine, et la partie variable murine, donc un site de liaison dirigé contre le TNF-α murin
- **Adalimumab** : anticorps monoclonal IgG1 complètement humain
- **CDP870** : anticorps anti-TNF-α humain, dont le fragment Fab' est lié à une molécule de PEG

Les premières études ont été réalisées avec l'infliximab. Ce dernier est capable de se lier aux formes membranaires et solubles du TNF-α avec une forte affinité. Son efficacité thérapeutique a été évaluée chez l'animal dans l'AEC[195], puis en essai clinique dans de nombreuses pathologies : polyarthrite rhumatoïde, spondylarthropathie ankylosante, maladie de Crohn, psoriasis, choc septique, uvéite… L'infliximab a d'abord été approuvé pour son utilisation dans la maladie de Crohn. Il s'est avéré efficace pour traiter la polyarthrite rhumatoïde[196], mais pose le problème du développement d'anticorps anti-infliximab ; c'est pourquoi, dans le traitement de la PR, l'infliximab est toujours utilisé en combinaison avec le méthotrexate[197]. L'utilisation d'infliximab chez les patients atteints de PR est aujourd'hui devenue assez courante.

Ce problème d'immunogénicité[198], mais aussi les problèmes de réaction d'infusion et d'hypersensibilité retardée, ont contribué au développement d'anticorps monoclonaux humains, adalimumab. Ces anticorps peuvent désormais être produits de manière assez simple par technique de phage display *in vitro*. Ils possèdent une affinité et une demi-vie voisines de celle de l'infliximab, et présentent l'avantage d'être administrés par voie sous-cutanée. L'utilisation d'adalimumab s'est avérée efficace seule ou en combinaison avec le méthotrexate (effet additif) dans le traitement de la PR[162]. Ce traitement est aussi à l'étude pour le psoriasis, et la maladie de Crohn[199]. Les études portant sur l'immunogénicité de l'adalimumab doivent cependant être poursuivies[200].

Récemment, une forme pegylée (CDP870) a été proposée, dans le but d'augmenter la demi-vie de la protéine circulante. Cette protéine a une demi-vie d'environ 14 jours, et conserve une affinité pour le TNF équivalente à celle de l'infliximab. Cette molécule est actuellement à l'étude dans la PR et la maladie de Crohn[201,202], un essai clinique de phase II ayant débuté en octobre 2002. Cependant, à forte dose, des anticorps dirigés contre la protéine ont été mis en évidence ; d'autres études sont donc encore nécessaires pour s'assurer de la potentialité de ce traitement chez l'homme.

L'activité inhibitrice du TNF-α par ces anticorps est liée à la formation d'un complexe stable avec le TNF-α, qui est ensuite dégradé. Cependant, ces anticorps sont aussi capables de se lier au TNF-α membranaire, et d'induire l'apoptose de la cellule par cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC) ou du complément (CDC). Or, dans le cas de la PR, les articulations présentent des niveaux élevés de LT CD4+ et de macrophages, qui expriment tous deux le TNF membranaire. Les anticorps anti-TNF peuvent donc aussi avoir un effet protecteur du fait de leur liaison à ces cellules via le TNF membranaire, qui conduit à la destruction de ces cellules, productrices de médiateurs pro-inflammatoires dans la pathologie[203]. Cet effet n'a pour l'instant été démontré qu'avec l'infliximab.

III.4.2 *Les récepteurs solubles*

Les récepteurs du TNF-α existant de manière physiologique sous forme soluble, leur utilisation comme agent bloquant du TNF-α a été assez naturelle. Cependant, ils sont rarement utilisés dans leur forme native monomérique, pour deux raisons principales : à cause de leur faible stabilité *in vivo*, moins de deux heures pour le TNFR-Is[48], mais aussi car le TNF-α soluble étant trimérique, il faut bloquer plusieurs sous-unités de la molécule pour empêcher son activité biologique. Le développement de constructions basées sur le récepteur soluble du TNF vise donc à augmenter la demi-vie de la protéine et à créer un environnement stérique empêchant la liaison du TNF-α à ses récepteurs membranaires.
Les principales molécules étudiées sont :

- **Etanercept** : construction associant deux portions extracellulaires du récepteur de type II du TNF-α humain couplées au fragment Fc d'une IgG1 humaine
- **Lenercept** : identique à l'etanercept avec utilisation du TNFR-Is
- **Dimère PEG** : deux fragments de TNFR-Is humain couplés au PEG
- **Monomère PEG** : un fragment de hTNFR-Is (complet ou non) couplé au PEG
- **Onercept** : protéine recombinante hTNFR-Is

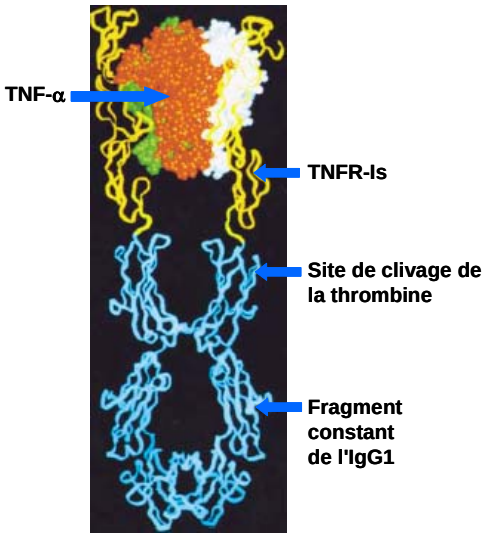


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de l'interaction entre le TNF-α et une protéine de fusion équivalente au lenercept (d'après Bazzoni et Beutler[15]).

A la différence des anticorps anti-TNF, les récepteurs solubles sont capables de se lier au TNF-α membranaire et soluble, mais aussi au TNF-β.

Les protéines fusionnées présentent une stabilité semblable à une immunoglobuline (environ 5 jours pour l'etanercept), mais surtout une affinité de liaison et une capacité à neutraliser le TNF-α nettement plus élevée que les TNFRs monomériques[204]. Cette observation conforte l'hypothèse selon laquelle il faut bloquer plusieurs sous-unités du TNF-α trimérique pour empêcher son activité biologique, la transduction du signal nécessitant la fixation simultanée de plusieurs ligands.
La comparaison entre la protéine fusionnée TNFR-Is/IgG et un anticorps anti-TNF a été réalisée *in vitro* et *in vivo*, dans un modèle d'infection, mettant en évidence une activité biologique au moins dix fois supérieure pour la protéine TNFR-Is/IgG[205]. Cependant, la comparaison de l'etanercept à l'infliximab *in vitro* dans une étude différente, a montré que les complexes TNF-etanercept étaient

moins stables que les complexes TNF-infliximab, et se dissociaient plus rapidement, relarguant du TNF-α bioactif[206]. Cependant, la pertinence de ces mécanismes reste à vérifier *in vivo*.
Dans cette même étude est suggéré un mécanisme de liaison différent du TNF avec l'etanercept et l'infliximab. L'infliximab serait en effet capable de se lier à une seule sous-unité de TNF, contrairement à l'etanercept. Ainsi, trois molécules d'infliximab peuvent se lier chacune à une sous-unité du même TNF trimérique, tandis que, même en large excès, une molécule d'etanercept se lie à une molécule de TNF. Une molécule d'infliximab peut donc se lier à deux sous-unités de molécules différentes de TNF, et surtout se lier à un monomère transmembranaire de TNF, tandis que l'etanercept ne peut se lier au TNF transmembranaire que lorsque celui-ci est associé en trimère.

Les deux récepteurs solubles physiologiques du TNF-α sont capables de se lier au TNF et d'inhiber son activité biologique, *in vitro* et *in vivo*. Deux études différentes, réalisées dans un modèle de choc septique au LPS[207,208] ont mis en évidence que le TNF-α n'était pas lié au TNFR-IIs de manière irréversible, et que ce récepteur prolongeait l'expression sérique du TNF-α en le relarguant progressivement. Cependant, dans des modèles animaux de PR, les deux types de récepteurs ont été utilisés avec succès[158,209]. Chez l'homme, seule la protéine hTNFR-IIs/hIgG1 est utilisée et a prouvé son efficacité seule[210] ou en combinaison avec le méthotrexate[211], par administration sous-cutanée deux fois par semaine.

D'autres approches pour stabiliser les TNFRs reposent sur l'utilisation de PEG soit pour former un dimère de récepteur soluble, soit simplement attaché au monomère. Les dimères pegylés présentent une structure secondaire et un arrangement des chaînes latérales identiques au récepteur soluble natif[212], ce qui laisse espérer une bonne activité biologique. Son évaluation a été réalisée *in vitro* puis chez le primate, et a montré une protection efficace contre un choc septique induit par le LPS[213]. Ces constructions ont aussi prouvé leur efficacité dans des modèles expérimentaux de PR, d'hépatite, de pancréatite. Cependant, des anticorps contre ces formes pégylées ont été mis en évidence, et seule une forme monomérique de TNFR-Is ne comprenant qu'une partie du domaine extracellulaire liée à un PEG est non immunogène chez le babouin, et permet sa protection dans un modèle de choc septique[214]. Cette forme monomérique a par contre une affinité plus faible envers le TNF-α et doit donc être présente en large excès pour inhiber efficacement le TNF (quantité 5 à 10 fois supérieure aux constructions dimériques). Ces constructions monomère-PEG ont aussi été testées avec succès dans des modèles expérimentaux d'arthrites, seules ou en association avec le méthotrexate[215,216].

L'onercept, malgré son instabilité attendue, est actuellement en évaluation clinique de phase II dans le traitement de la maladie de Crohn. Sa demi-vie terminale a été estimée à 15 heures, avec une élimination rénale étonnamment lente, et aucune formation d'anticorps après six injections[217,218].

III.4.3 *Etude du mécanisme d'action des anti-TNF-α*

Ces mécanismes ont surtout été étudiés pour l'infliximab, dans la polyarthrite rhumatoïde[219,220].

III.4.3-a) Effets sur le réseau des cytokines

Quelques heures après injection d'infliximab, on peut observer une diminution sérique de CRP et d'IL-6. Les taux locaux (membrane synoviale) d'IL-6 et d'IL-1 sont aussi réduits, ce qui suggère bien l'existence d'une cascade de cytokines, dépendante du TNF-α. On remarque aussi une diminution des taux circulants d'IL-1Ra et de TNFRs[221]. Cette inhibition simultanée de médiateurs pro et anti inflammatoires montre qu'il n'y a pas une complète restauration de l'équilibre de la balance des cytokines. Ceci est en accord avec l'observation que les traitements protéiques anti-TNF ne

permettent pas un effet à long terme et requièrent le maintien du traitement, sans lequel la maladie "repart".

III.4.3-b) Effets sur le recrutement cellulaire

Le traitement par infliximab induit une réduction du nombre de leucocytes recrutés dans la membrane synoviale. La diminution est liée à celle des molécules d'adhésion et des chimiokines. Cette observation a pu être effectuée directement chez l'homme, à l'aide de leucocytes autologues marqués à l'^{111}indium[222].

III.4.3-c) Effets sur l'apoptose

Des études récentes ont été réalisées sur l'induction d'apoptose par les traitements anti-TNF. La comparaison d'etanercept et infliximab chez des patients atteints de la maladie de Crohn[223] met en évidence l'induction d'apoptose des lymphocytes activés et l'activation de la capsase 3 suite au traitement par infliximab, mais non par etanercept. L'etanercept n'étant pas efficace dans le traitement de la maladie de Crohn, cette différence d'activité apoptotique pourrait contribuer à expliquer la différence d'activité thérapeutique. Une autre étude réalisée chez des patients atteints de PR[224] met en évidence une augmentation de l'apoptose des monocytes/macrophages du liquide synovial, et dans une moindre mesure du sang périphérique suite au traitement par infliximab ou etanercept. Dans cette même étude, ces traitements n'ont par contre pas augmenté l'apoptose lymphocytaire. L'impact des traitements anti-TNF sur l'apoptose reste donc à approfondir.

III.4.3-d) Effets sur l'angiogénèse

Dès le début de la maladie, l'inflammation de la synoviale arthritique s'accompagne d'une augmentation de l'angiogénèse. Cette augmentation de la densité des vaisseaux permet l'intensification du trafic des cellules immunes et inflammatoires dans l'articulation. Les patients traités par infliximab présentent une diminution des taux de VEGF circulant et une diminution de la néovascularisation.

III.4.3-e) Effets sur le cartilage et l'os

L'effet protecteur des anticorps anti-TNF a été mis en évidence par des analyses histologiques effectuées sur modèles animaux[159]. On observe ainsi une diminution du pannus, et une protection de la destruction du cartilage et de l'os. Ces observations ont aussi été réalisées par radiographie chez l'homme. Les taux sériques de MMP-1 et MMP-3 sont réduits. La diminution de la destruction osseuse peut aussi être liée à une diminution du recrutement des monocytes et de leur différenciation en ostéoclastes.

III.5. Inhibiteurs de la transduction cellulaire induite par liaison du TNF-α à ses récepteurs

Il est envisageable de bloquer les séquences PLAD des monomères de récepteur du TNF, ce défaut d'assemblage rendant le récepteur non fonctionnel ; cette voie n'a pas encore été explorée.
Par ailleurs, la fixation du TNF à ses récepteurs entraîne la transcription de nombreux gènes, essentiellement par la voie NF-κB et des MAPK ; les mêmes stratégies d'inhibition que celle utilisées pour inhiber la transcription du TNF sont donc exploitables.

III.6. Autres perspectives thérapeutiques anti-TNF-α

III.6.1 *Cytokines anti-TNF-α*

Les cytokines anti-inflammatoires comme IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, TGF-α, LIF inhibent le TNF-α, mais aussi l'IL-1, l'IL-6, et l'IL-8, en particulier dans l'environnement synovial de patients atteints de PR[225,226]. Ces cytokines ont démontré leur intérêt dans les modèles expérimentaux d'arthrites[227], de colite ou d'autres affections inflammatoires, surtout quand elles sont combinées[228] ; cependant leur utilisation chez l'homme n'a pas apporté de résultats concluants. Récemment, le rôle immunosuppresseur de l'IFN-β a été décrit dans un modèle d'arthrite[229].

III.6.2 *Vaccination anti-TNF-α*

Expérimentalement, l'immunisation de souris avec du TNF-α murin modifié par l'introduction d'un épitope T-dépendant se traduit par l'apparition d'anticorps anti-TNF polyclonaux[230]. Lorsque cette immunisation est réalisée dans des modèles murins de cachexie ou de PR, on observe une amélioration des signes de la maladie. Cependant, les modalités et les conséquences exactes de ce type d'immunisation ne sont pas encore assez connues pour envisager une approche chez l'homme.
L'immunisation anti-TNF peut aussi être réalisée à l'aide de peptides issus du TNF-α et sélectionnés par modélisation moléculaire pour leur forte interaction avec ses récepteurs. Ainsi, des peptides cycliques d'une vingtaine d'acides aminés ont conduit à la production d'anticorps anti-TNF neutralisants et ont permis la protection de souris dans un modèle de choc septique au LPS[231].

IV. La thérapie génique

IV.1. Approche thérapeutique

Née au milieu des années 80, la thérapie génique repose sur l'introduction de matériel génétique (ADN ou ARN) dans le noyau des cellules d'un patient, afin qu'il soit exprimé et produise ainsi un effet thérapeutique.
Différentes approches peuvent être envisagées[232] :

- Corriger un défaut de fonction par apport d'un gène fonctionnel dans les cellules, ce qui permet de s'attaquer aux causes de la maladie.
- Transférer un gène codant une protéine thérapeutique, dans le but de soigner, prévenir ou ralentir la progression de certaines maladies.
- Introduire un gène conduisant à la mort d'une cellule malade.
- Introduire un ADN antisens inhibant la formation d'une protéine ou la réplication d'un virus.

La thérapie génique semble donc une alternative de choix pour lutter contre des maladies traitées actuellement de manière imparfaite ou non traitées par les approches pharmaceutiques conventionnelles.
Initialement développée dans les maladies monogéniques au cours desquelles le dysfonctionnement d'un gène unique est en cause (mucoviscidose, hémophilie, …), cette stratégie thérapeutique consiste à apporter dans la cellule la version fonctionnelle du gène défectueux pour pallier sa fonction déficiente. Le concept de la thérapie génique s'est rapidement étendu aux maladies polygéniques (cancers, maladies neurodégénératives, maladies infectieuses, maladies auto-immunes).

La thérapie génique présente de nombreux avantages comparés à l'administration de protéines recombinantes. En effet, la production à grande échelle de protéines recombinantes coûte très chère, et leur efficacité reste limitée à cause d'une rapide élimination de la circulation sanguine. Celle-ci entraîne la nécessité d'injections répétées et à forte dose de la protéine recombinante. Les forts taux circulants obtenus, ainsi que la répétition des injections entraînent fréquemment des effets indésirables, voire une certaine toxicité. La thérapie génique, par contre, permet une production à long terme, et potentiellement régulée de protéine thérapeutique. Elle peut aussi permettre une expression localisée du transgène, évitant tout risque lié à la présence systémique de protéine[233].

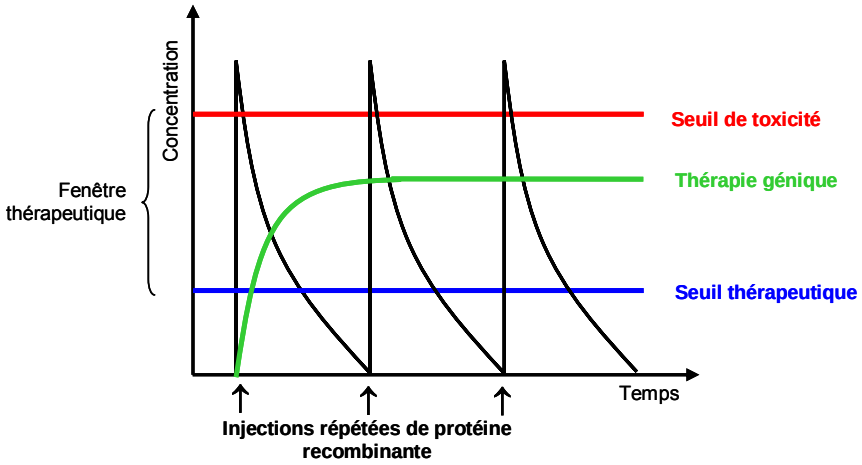


Figure 9 : Avantages de la thérapie génique par rapport aux injections répétées de protéine recombinante.

Depuis le premier essai clinique en 1989, plus de 900 essais ont été réalisés, sont en cours, ou ont été approuvés, avec plus de 100 gènes distincts transférés, dont 26% de cytokines[234]. La liste des essais cliniques est consultable à l'adresse : http://82.182.180.141/trials/index.html. Si à l'origine la thérapie génique s'adressait plutôt au traitements des maladies monogéniques héréditaires, la tendance a bien évolué puisque 66% des essais actuels visent le traitement des cancers, contre environ 10% pour les maladies monogéniques. Les autres domaines d'application principaux sont les maladies vasculaires et infectieuses.

IV.2. Les outils de thérapie génique

L'utilisation de la thérapie génique requiert la mise au point de méthodes efficaces pour introduire le gène d'intérêt dans les cellules cibles, appropriées à la situation. La connaissance du défaut génétique ou de l'origine des dysfonctionnements responsables de la maladie est aussi indispensable pour déterminer le gène cible.

IV.2.1 *La cellule cible*

Les stratégies de thérapie génique actuelle ne doivent être réalisées, par principe éthique et légal, que sur les cellules somatiques, et non pas sur les cellules germinales, afin d'éviter la transmission des caractères modifiés à la descendance[235].

Le transfert de gène peut être réalisé selon deux méthodes :

- L'approche *in vivo* consiste à introduire le gène thérapeutique grâce à un vecteur directement au sein de l'organe ou du tissu cible (voie locale) ou par voie sanguine (voie systémique). L'administration locale présente l'avantage de concentrer l'ADN thérapeutique dans le tissu cible et d'éviter une trop grande perte par le système réticulo-endothélial. L'administration systémique conduit à une localisation préférentielle dans le foie, les poumons ou les reins, mais présente des risques de toxicité au niveau des organes non ciblés[142].
- L'approche *ex vivo* consiste à prélever les cellules cibles chez le patient et à les modifier génétiquement avec le gène d'intérêt. Les cellules porteuses du gène, obtenues après multiplication et sélection *in vitro*, sont ensuite réintroduites chez le patient. Cette stratégie, utilisée dans environ 80% des essais cliniques, est réalisée préférentiellement sur des cellules faciles à prélever et à mettre en culture : cellules souches de la moelle osseuse, cellules tumorales, fibroblastes de la peau, cellules dendritiques. La principale limite de cette technique est l'obligation d'utiliser des cellules autologues afin d'éviter toute réponse immune. L'utilisation de cellules encapsulées peut permettre de surmonter cette difficulté lorsque la protéine thérapeutique est secrétée[236]. Cette approche *ex vivo* a permis récemment un premier succès thérapeutique en France pour corriger une immunodéficience sévère liée à l'X par l'équipe d'Alain Fischer[237], ainsi que pour une déficience en adénosine déaminase[238].

IV.2.2 *Le gène d'intérêt*

Le transgène est relativement facile à définir dans le cas des maladies monogéniques. Au contraire, dans les maladies polygéniques, comme la polyarthrite rhumatoïde, le choix du gène d'intérêt est plus délicat et repose sur la connaissance des mécanismes physiopathologiques de la maladie.

Dans le cas des maladies à composante inflammatoire et/ou auto-immune, plusieurs types de cibles peuvent être définies[233] :

- Des gènes visant à reconstituer l'expression d'une protéine manquante, par exemple l'insuline dans le cas du diabète de type I.
- Des gènes ciblant la réaction inflammatoire, comme les TNFRs, l'IL-1Ra, l'IL-4, l'IL-10, …
- Des gènes inducteurs de tolérance, afin d'éliminer les lymphocytes T autoréactifs ; ceci peut être réalisé en favorisant l'expression de peptides auto-antigéniques associés au CMH dans des cellules dendritiques.
- Des gènes codant des protéines liées aux processus associés à la pathologie, comme par exemple l'utilisation d'un gène codant un inhibiteur de NF-κB, FASL ou un gène suicide.
- Des gènes permettant la réparation tissulaire, comme les facteurs de croissance FGF ou NGF.
- Etc…

IV.2.3 *Le système de transfert de gène : les vecteurs*

La principale limite de la thérapie génique réside dans le développement de système de transfert de gènes. En effet, pour parvenir au noyau de la cellule cible, le gène thérapeutique doit surmonter plusieurs barrières biologiques, et l'utilisation de vecteurs "transporteurs" du gène thérapeutique est nécessaire (tableau 4).

Les virus, de part leurs propriétés naturelles, offrent des systèmes efficaces de pénétration intracellulaire et éventuellement de persistance du matériel génétique (pour revue générale, voir Kay *et al*[239]). Ce sont donc naturellement les premiers vecteurs à avoir été utilisés. Ils reposent sur l'utilisation du matériel génétique des virus pour le transport d'ADN au sein de la cellule cible, mais le génome du virus est modifié afin de supprimer les séquences permettant sa réplication ainsi que les séquences responsables de sa virulence, et afin d'y incorporer les séquences d'intérêt thérapeutique. Le virus modifié conserve ainsi sa capacité de pénétration dans les cellules, il permet la production de la protéine d'intérêt thérapeutique, mais sans production de particules virales.
Les différents types de vecteurs viraux utilisés sont représentés dans le tableau 4.

Ces vecteurs possèdent une bonne efficacité de transfection, mais posent des problèmes d'immunogénicité, de toxicité, ainsi que des difficultés de production de lots cliniques. De plus, un problème majeur est le risque d'intégration aléatoire dans le génome de la cellule transfectée. Cette complication a été rencontrée par l'équipe d'Alain Fischer lors de l'utilisation d'un rétrovirus dérivé du MLV (murine leukemia virus) chez des enfants atteints d'immunodéficience sévère liée au chromosome X[240,241]. En effet, les rétrovirus utilisés ne s'intègrent pas totalement de manière aléatoire dans le génome, mais préférentiellement proche des sites d'initiation de la transcription de gènes actifs. Dans ce cas l'intégration a eu lieu dans une région d'activation de proto-oncogène (LMO2, qui code un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de l'hématopoïèse) ; cette intégration entraîne la surexpression de LMO2 pathogène, et une leucémie. Ces complications ont conduit à l'arrêt de cet essai.
Ces problèmes ont incité les chercheurs à développer des vecteurs non viraux de transfert de gènes, plus sûrs.

IV.2.3-a) Les vecteurs non viraux

Ces vecteurs présentent l'avantage d'être peu immunogènes, et donc de permettre des administrations répétées, de ne pas avoir de taille limite théorique de la cassette d'expression, et d'être facile et peu cher à produire.
Ces méthodes sont actuellement en plein essor, et depuis l'injection d'ADN plasmidique nu, de nombreuses méthodes chimiques, physiques ou cellulaires se sont développées.

✓ *ADN nu*

L'injection d'ADN nu plasmidique est le système d'administration le plus simple, et le moins cher, mais il n'était pas du tout évident qu'une simple injection d'ADN permette la transfection de cellules *in vivo*. En 1990, Wolff *et al* ont montré qu'un ADN nu injecté directement dans le muscle permet une expression efficace et pendant plusieurs mois du transgène par les fibres musculaires[242].

Cette découverte a ouvert la voie à de nombreuses applications dont l'utilisation du muscle pour produire des protéines secrétées ou la vaccination. En effet, l'injection i.m de plasmides codant des protéines virales permet d'obtenir une réponse immune humorale et cellulaire efficace[243,244]. Dans ce cadre, la présence sur les plasmides de séquences bactériennes riches en motifs CpG favorise les réponses inflammatoire et immunitaire[245]; ceci est donc très intéressant pour la vaccination, mais devient un inconvénient pour le traitement de maladies, encore plus pour le traitement de maladies inflammatoires.
Le muscle squelettique n'est pas le seul organe cible pour l'injection d'ADN nu ; en effet, l'expression du transgène suite à une injection d'ADN nu a été démontrée dans de nombreux organes ou tissus : les articulations[246], la peau[247], le foie[248], la thyroïde[249], le muscle cardiaque[250], le cerveau[251], le rein[252], le thymus[253], les tumeurs[254].

Les organes prometteurs pour cette approche restent le muscle et la peau ; on note ainsi un essai clinique de phase I-II par injection i.m d'ADN nu codant le VEGF dans le traitement des neuropathies diabétiques. Cependant, une approche systémique, avec administration par voie intraveineuse, ne peut être envisagée, car l'ADN nu subit une dégradation très rapide par les nucléases[142]. Il est alors nécessaire de le protéger de la dégradation et d'augmenter son temps de circulation, ceci pouvant être réalisé à l'aide de vecteurs chimiques.

✓ *Les vecteurs synthétiques*[255]

Les deux types de vecteurs synthétiques les plus développés sont les lipides cationiques et les polymères cationiques. Ils forment des complexes avec l'ADN chargé négativement par interactions électrostatiques.
Ces complexes chargés positivement favorisent le transfert d'ADN à l'intérieur de la cellule[256]. Cependant, les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus. Deux hypothèses dominent, la principale étant la voie de l'endocytose[257,258]. L'autre hypothèse suggère que le complexe fusionne avec la membrane plasmique, libérant l'ADN dans le cytoplasme[259].
L'utilisation de ces vecteurs représente environ 10% des essais de thérapie génique actuels.

Vecteur	Génome	Taille de l'insert	Immunogénicité	Intégration dans le génome	Durée d'expression	Cellules cibles	Avantages	Inconvénients
Adénovirus	ADN double brin	5-8 kb	Forte	Non	6 semaines	En division et quiescentes	Adapté pour une expression à court terme *in vivo*	Plus de 50% de la population humaine a des anticorps pré-existants ; n'infecte pas les lymphocytes
Gutless Adénovirus	ADN double brin	37 kb	Faible	Non	> 1 an	En division et quiescentes	Adapté pour une expression à long terme	Difficile à produire ; nécessite un vecteur auxiliaire pour l'apport des protéines permettant la réplication
AAV	ADN simple brin	4 kb	Faible	?	Jusqu'à 1 an	En division et quiescentes	Adapté pour une expression à long terme	Taille de l'insert limitée à 4kb ; 30% de la population humaine a des anticorps pré-existants (selon les sérotypes)
Herpes virus simplex	ADN double brin	35 kb	Forte	Non	> 6 mois	En division et quiescentes	Peut exprimer plusieurs gènes ; principalement "neurotropique" *in vivo*	Induit une toxicité cellulaire et une inflammation
Rétrovirus	ARN simple brin	7 kb	Faible	Oui	Pendant toute la durée de vie de la cellule	En division	Adapté pour des applications ex vivo	Risques d'effets liés à l'insertion aléatoire dans le génome
Lentivirus	ARN simple brin	7 kb	Faible	Oui	Pendant toute la durée de vie de la cellule	En division et quiescentes	Peut être produit à titres élevés	Risques d'effets liés à l'insertion dans le génome
Plasmide	ADN double brin	Illimitée	Faible (peut être augmentée par la présence de CpG)	Non	> 2 ans dans le muscle ; court terme dans les autres tissus	En division et quiescentes	Facile à produire ; peu cher ; efficacité de transfection peut être améliorée par des vecteurs physiques ou chimiques	Mécanismes intrinsèques d'entrée dans la cellule mal connus

Tableau 4 : Propriétés des différents vecteurs utilisés en thérapie génique.

- **Les lipides cationiques** sont des molécules monomériques constituées de trois domaines : une tête cationique permettant la liaison à l'ADN, une ou plusieurs chaînes hydrophobes, et un espaceur séparant les deux éléments.

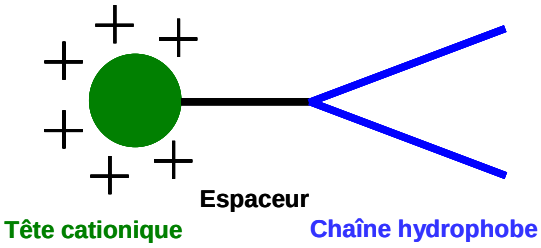


Figure 10 : Représentation schématique d'un lipide cationique.

Les complexes formés avec l'ADN sont appelés lipoplexes. L'efficacité du transfert de gène est dépendant du rapport de charge ADN/charges positives du lipide ; lorsque ce rapport est proche de un, les charges sont neutralisées et les complexes s'aggrègent, ce qui défavorise la transfection *in vivo*. Des lipides neutres tels que le DOPE (dioléoylphosphatidyl éthanolamine) ou le cholestérol sont généralement ajoutés lors de la formulation des complexes afin de faciliter la fusion du complexe avec les membranes cellulaires puis sa dissociation en milieu acide, dans la cellule[260].
Le premier lipide cationique utilisé en 1987, est le DOTMA (chlorure de dioléoyloxypropyl-triméthylammonium)[259]. Outre le DOTMA, les lipides cationiques les plus fréquemment utilisés sont le DOTAP (dioléoyloxypropyltriméthylammonium propane), le DOSPA (trifluroacétate de dioléoyloxy[(spermine-carboxyamido)éthyl]diméthylpropanaminium) ou encore la DOGS (acide trifluoroacétique dioctadécylamidoglycylspermine).
Même si l'efficacité de transfection obtenue par ces vecteurs reste faible, ils ont été utilisés dans des essais cliniques pour le traitement de la mucoviscidose et de différents cancers[261].

- **Les polymères cationiques** sont des molécules riches en amines, en lysines ou encore en arginines, groupements protonés à pH physiologique, ce qui permet une association à l'ADN par des interactions électrostatiques multiples. Les complexes formés sont nommés polyplexes. Les polyamines, définissant un large spectre de protonation, sont les plus efficaces ; les complexes polyamines/ADN sont en effet encore capables de se protoner lorsqu'ils sont emprisonnés dans les endosomes, et cet effet tampon expliquerait l'activité endosomolytique qui favorise le passage transmembranaire de l'ADN vers le cytosol[262]. La poly(L-Lysine) était à l'origine le polymère cationique le plus utilisé. Depuis, il a été montré que les dendrimères et le PEI[263] sont capables de former des complexes très efficaces pour le transfert de gènes *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, le PEI a été utilisé dans le cerveau, le rein et le poumon par voie intraveineuse ou en instillation intratrachéale[264].

L'injection de complexes de lipides cationiques ou de polymères cationiques dans la circulation systémique est décevante. En effet, ils activent souvent le complément et sont rapidement détruits par le système phagocytaire-mononuclée[265]. D'autre part, les charges positives présentes sur les complexes, importantes pour les interactions avec les membranes cellulaires, interagissent malheureusement avec les protéines du sérum, ce qui entraîne la formation d'agrégats qui inhibent la transfection et peuvent conduire à une embolisation au niveau de la microcirculation des organes. D'autres formulations ont donc été proposées, avec utilisation de polyéthylène glycol afin de masquer

les charges positives des complexes[266]. Cependant, la diminution du nombre de charges positives à la surface des complexes diminue nettement leurs interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires, et donc l'efficacité de transfection[267].

L'ajout d'une tête de ciblage exposée à la surface des complexes constitue alors une approche intéressante pour obtenir à nouveau des complexes transfectants et dirigés vers des cellules cibles. La stratégie de ciblage la plus employée est la reconnaissance d'un récepteur spécifique d'un type cellulaire. Les ligands utilisés sont par exemple des motifs RGD[268], des folates, des sucres ou encore des fragments d'anticorps. Ce ciblage permet l'interaction des complexes ADN/vecteur avec les membranes cellulaires, cependant l'ADN doit encore atteindre le noyau, et dans ce but, de nombreuses barrières biologiques restent à franchir. Elles sont explicitées dans la revue de Brown *et al*[264].

IV.2.3-b) Les vecteurs cellulaires

Des cellules en culture peuvent constituer des vecteurs de gènes après transfection et sélection. Les méthodes de thérapie génique cellulaire font appel à différents types cellulaires selon le but recherché.

- ✓ ***Vecteurs cellulaires inertes***

Dans ce cas, les cellules jouent le rôle de pompe protéique. Les recherches actuelles ont démontré l'intérêt des lignées cellulaires stables comme les kératinocytes et les fibroblastes (cellules CHO ou COS par exemple), dont les avantages majeurs sont la facilité de mise en culture *in vitro* et la capacité à synthétiser des protéines complexes de haut poids moléculaire. *In vivo* chez le petit animal, les fibroblastes transfectés ont trouvés de nombreuses applications : greffe de fibroblastes primaires de peau infectés par un rétrovirus codant l'hormone de croissance humaine[269] ou l'érythropoïétine[270], greffe de fibroblastes ou de kératinocytes transfectés par un plasmide codant respectivement l'IL-13[271] ou l'IL-1RII[272]. Chez l'homme, des essais cliniques de phase I ont été réalisés avec des fibroblastes cutanés autologues transfectés avec un plasmide codant le facteur VIII dans le traitement de l'hémophilie A, et ont montré que la greffe était bien tolérée par les patients et permettait d'augmenter de façon significative les taux circulants de facteur VIII[273]. D'autres essais sont en cours avec des fibroblastes autologues infectés par un rétrovirus codant le Nerve Growth Factor (NGF) et injectés par voie intracrânienne, afin de lutter contre la maladie d'Alzheimer.

- ✓ ***Vecteurs cellulaires non inertes***

Les cellules utilisées sont alors des cellules souches, des cellules précurseurs, issues de la division des cellules souches et ayant acquis un certain degré de spécialisation, ou des cellules différenciées.
Cette stratégie peut être utilisée dans un but de régénération tissulaire et de lutte contre les maladies neurodégénératives. Ainsi, une stratégie d'implantation de précurseurs neuronaux est utilisée chez l'homme pour le traitement de la maladie de Huntington, par administration du facteur de croissance NGF[274].
D'autres types cellulaires peuvent être utilisés, comme les monocytes, macrophages, lymphocytes ou cellules dendritiques afin d'obtenir un effet immunomodulateur. Ainsi, un premier essai d'injection de macrophages transfectés par le gène lacZ chez des souris mdx a montré la production de la protéine au niveau musculaire et validé le système[275] ; de même, des clones de lymphocytes T CD4+ dirigés contre des auto-antigènes des cellules des îlots β ont été utilisés chez la souris NOD pour lutter contre le diabète auto-immun[276]. Dans l'AEC, le transfert de splénocytes ou de LT purifiés pathogènes, transfectés par le TGF-β, chez des souris SCID ou DBA/1 a diminué l'inflammation et prévenu son

extension aux articulations non encore atteintes lors du traitement[277]. Des cellules dendritiques infectées par un adénovirus codant l'IL-4 ont aussi prouvé leur efficacité dans l'AEC[278].

IV.2.3-c) Les méthodes physiques de transfert de gène

Les méthodes physiques de transfert de gène sont actuellement en plein essor, et de nouvelles méthodes voient le jour régulièrement (pour revue générale : Wells *et al*[279]).

✓ ***Le canon à ADN : gene gun***

Cette technique, utilisée depuis les années 90, consiste à bombarder un tissu ou des cellules cibles avec des billes d'or ou de tungstène de diamètre 1 à 5 µm recouvertes d'ADN. Cette technique est applicable aussi bien *in vitro* que *in vivo* sur de nombreux organes (peau, foie, rein, muscle) sans endommager le tissu. Cependant, hormis pour les tissus superficiels, cette méthode nécessite une intervention chirurgicale et n'aboutit qu'à des niveaux moyens d'expression du transgène[280]. Récemment, Dileo *et al* ont pu atteindre le tissu sous cutané en modifiant le dispositif classique, et en utilisant un système de projection des billes sous haute pression[281].
Les utilisations majeures de cette technique restent l'utilisation sur cellules végétales, qui est à l'origine de la méthode, et la vaccination génétique. En effet, l'épiderme contient des cellules de Langerhans, qui sont des cellules présentatrices de l'antigène, transfectées de manière simple et efficace par le gene gun[282].

✓ ***Transfection hydrodynamique***

Cette méthode efficace et récente repose sur l'injection d'un volume élevé (équivalent au volume sanguin) de solution plasmidique dans la veine de la queue chez la souris ou le rat, qui conduit à une expression préférentielle répartie dans le foie. Cette méthode a aussi permis de cibler le rein, le diaphragme et les muscles ; l'injection hydrodynamique réalisée par voie intra-artérielle cible le muscle, et permet alors une transfection relativement uniforme de tous les muscles de la patte perfusée[283]. Cette technique est utilisée actuellement pour transférer le gène de la dystrophine dans un modèle canin de dystrophie musculaire.

✓ ***Les ultrasons***

Cette méthode présente l'avantage d'être non invasive. Elle utilise des ultrasons de faible ou forte intensité, et permet la transfection du muscle, de l'artère carotidienne ou du cœur[284-286].
Récemment, une combinaison d'ultrasons et d'impulsions électriques a été utilisée, et nommée électro-sonoporation. Dans cette technique, l'ADN est injecté en i.m, puis le muscle est soumis aux ultrasons pendant cinq minutes, avec des impulsions électriques délivrées au milieu de l'application des ultrasons[287]. Cette méthode a été utilisée pour vectoriser un gène codant l'IL-12 dans un modèle tumoral chez la souris.

✓ ***Laser et champs magnétiques***

Un laser femtoseconde à infrarouge a été utilisé récemment chez la souris et a permis de transfecter des cellules musculaires[288]. Ce laser, focalisé sur une zone à 2 mm de profondeur, permet une expression efficace et à long terme du transgène, sans induire de dommages musculaires. L'utilisation de cette méthode permettait ainsi une expression élevée d'érythropoïétine durant 8 semaines, permettant d'atteindre un taux d'hématocrite supérieur à 22%.

Un champ magnétique peut être utilisé pour transfecter un ADN couplé à des nanoparticules paramagnétiques. Ce procédé récent porte le nom de magnétofection, et permet d'augmenter l'expression du transgène dans le tube gastro-intestinal et la vasculature de l'oreille[289].
Cependant, ces deux méthodes sont encore très récentes, et demandent des études complémentaires.

IV.2.4 *L'électrotransfert*

IV.2.4-a) Présentation de la méthode

En 1982, Neumann *et al* mettent en évidence la possibilité de transfecter des cellules *in vitro*, à l'aide d'impulsions électriques[290]. Ces chocs électriques provoqueraient la déstabilisation et la perméabilisation de la membrane de cellules de souris en suspension, favorisant ainsi l'entrée d'ADN exogène dans la cellule. Deux ans plus tard, la confirmation de ce résultat[291] ouvre la voie au développement de l'électroporation, c'est-à-dire l'utilisation d'un champ électrique afin d'induire la perméabilisation de cellules *in vitro*, et de permettre le transfert d'acides nucléiques dans les cellules bactériennes, de levures, végétales ou animales, méthode aujourd'hui utilisée en routine.
Les premières utilisations *in vivo* de la méthode d'électroperméabilisation ont été développées en 1989 et 1990 par Grasso *et al*[292,293] afin d'obtenir la fusion entre des cellules humaines HeLa et des cellules de la cornée ; cette électrofusion *in vitro*, résulte de la perméabilisation de deux cellules adjacentes.
L'électroperméabilisation peut aussi être utilisée afin d'administrer des drogues aux cellules. Ainsi, dès 1988, il a été mis en évidence que la toxicité de la bléomycine est 100 000 fois plus importante sur des cellules électroperméabilisées que sur des cellules non exposées aux impulsions électriques[294]. Depuis 1991[295], cette propriété a été développée avec succès jusqu'à l'application clinique pour faciliter l'entrée de bléomycine dans les tumeurs, c'est l'électrochimiothérapie. De nombreux essais cliniques sont en cours (pour revue, voir Gathelf *et al*[296]), principalement pour le traitement des tumeurs cutanées ou sous-cutanées chez l'homme[297,298] ou en application vétérinaire chez le cheval[299], et récemment pour le cancer du sein, à l'aide de cis-platine[300].
Les premiers travaux d'électrotransfert d'ADN *in vivo* ont été réalisés dans la peau en 1991[301], par utilisation d'impulsions électriques exponentielles, et en 1996, dans le foie à l'aide de trains d'impulsions de courtes durées (100 µs)[302]. En 1998, quatre équipes indépendantes ont montré l'efficacité de l'électrotransfert à l'aide d'impulsions de longue durée (5-50 ms) : Mir *et al*[303] et Aihara *et al*[304] dans le muscle squelettique, Rols *et al*[305] dans les tumeurs, et Suzuki *et al*[306] dans le foie.
Depuis, l'utilisation de cette technologie est toujours en plein essor, principalement dans le muscle squelettique ou les tumeurs[298,307-310]. Cependant, l'électrotransfert a été utilisé avec succès dans de nombreux tissus tels que les artères[311], la peau[312], le foie[313], le tendon[314], la vessie[315], la cornée[316], les cellules rétiniennes[317], la moelle épinière[318], et le cerveau[319].

IV.2.4-b) Potentialités du muscle comme organe sécréteur

L'électrotransfert en lui-même est très intéressant de part sa simplicité de réalisation, son faible coût, et surtout son efficacité[298,303,304,310,320].
Parmi les organes cibles, le muscle squelettique s'est rapidement révélé très prometteur. Il est tout d'abord un organe de choix grâce à son accessibilité et sa facilité de transfection. L'électrotransfert intramusculaire permet une expression à long terme du transgène, supérieure à un an, liée à la longue durée de vie des fibres musculaires[309,321]. L'avantage majeur de transfecter le muscle est sa

capacité à produire et sécréter des protéines biologiquement actives dans la circulation sanguine, ce qui permet d'obtenir des effets sur des cibles lointaines et/ou multiples[322].

L'électrotransfert intramusculaire permet d'augmenter l'expression du transgène de plusieurs ordres de grandeur (100 à 10 000 fois) par rapport à l'injection d'ADN nu, et de réduire considérablement la variabilité interindividuelle d'expression protéique[303,309]. De plus, la distribution de l'expression est bien répartie spatialement dans l'organe cible. La figure 11 illustre ces caractéristiques d'expression, sur l'exemple du transfert du gène rapporteur β-galactosidase par électrotransfert.

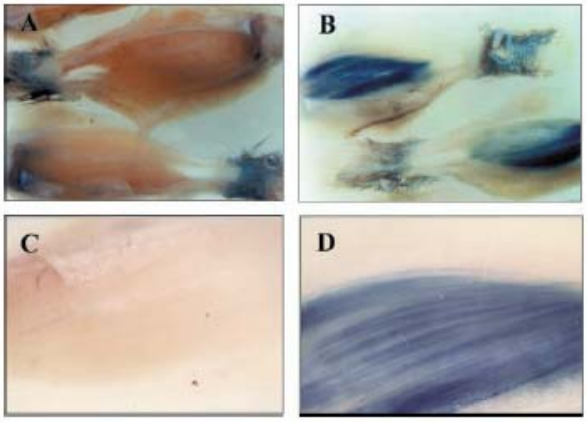


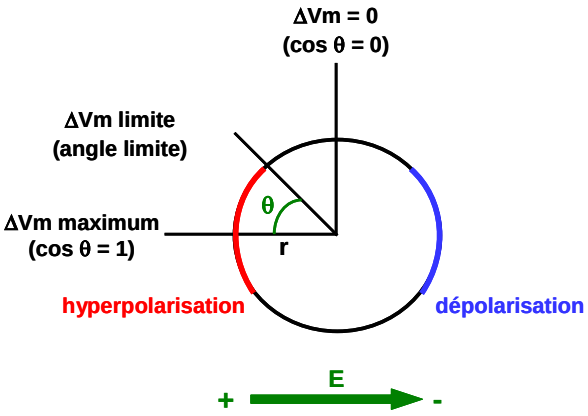
Figure 11 : Expression de la β-galactosidase dans le muscle tibial cranial de la souris sept jours après injection de l'ADN avec ou sans électrotransfert. L'activité β-galactosidase était révélée en bleu. Photos A et B : muscles de souris injectés avec le plasmide codant la β-galactosidase sans (A) ou avec électrotransfert (B). C et D : macrophotos de l'un de ces muscles sans (C) ou avec électrotransfert (D). D'après Mir et al[309].

IV.2.4-c) Conditions de réalisation de l'électrotransfert

Différentes formes d'impulsions électriques (créneau uni ou bipolaire, exponentielle), ayant une durée, une amplitude, et une fréquence différentes peuvent être utilisées. Les impulsions exponentielles sont principalement utilisées *in vitro*, l'exponentielle ayant une constante de temps dépendante de la résistance du milieu de culture. *In vivo*, des impulsions carrées unipolaires sont majoritairement utilisées, ce qui permet de fixer l'intensité du champ électrique et la durée des impulsions indépendamment de la résistance électrique du tissu.
Les conditions électriques doivent être adaptées aux cellules ciblées. En effet, les impulsions électriques modifient la différence de potentiel transmembranaire (ΔVm) de la cellule, créant une hyperpolarisation et une dépolarisation locales. Ces modifications sont proportionnelles au rayon de la cellule (r), au champ électrique appliqué (E) et à son angle d'incidence (θ) ; elles dépendent aussi de la forme de la cellule (f) et de la conductivité du milieu ($g(\lambda)$). Lorsqu'une valeur minimale est atteinte (200-300 mV), il y a perméabilisation de la cellule, celle-ci étant nécessaire pour obtenir une transfection efficace[323,324].

La relation entre le potentiel transmembranaire d'une part, le rayon de la cellule considérée comme une sphère, l'intensité du champ électrique, et son angle d'incidence d'autre part, est :

$$\Delta Vm = f.g(\lambda).r.E.\cos\theta$$



Le potentiel électrique E induit une différence de potentiel transmembranaire ΔVm :
$\Delta Vm = f.g(\lambda).r.E.\cos\theta$

Si ΔVm > 0,2-0,3 V : désorganisation des membranes biologiques et perméabilisation.

Figure 12 : Modèle théorique de l'électroperméabilisation pour une cellule.
***ΔVm** : différence de potentiel transmembranaire en Volts ; **f** : facteur dépendant de la forme de la cellule ; **g(λ)** : facteur dépendant de la conductivité du milieu ; **r** : rayon de la cellule en cm ; **E** : intensité du champ électrique en Volts/cm ; **θ** : angle entre la direction du champ électrique et la normale à la surface de la cellule au point considéré.*

La relation précédente montre que l'intensité minimale requise pour perméabiliser une membrane est inversement proportionnelle au rayon de la cellule. Ainsi, les fibres musculaires étant de longues cellules d'un diamètre de 10 à 100 µm, les conditions électriques utilisées *in vitro* sur des cellules plus petites et sphériques se sont révélées délétères[309]. Après de nombreuses expériences, il a été constaté que des impulsions répétées (8 à 10) à la fréquence de 1 ou 2 Hz, de longue durée (4-50 ms/impulsion) et peu intenses (100-500 V/cm) permettent d'atteindre de bons niveaux d'expression *in vivo*[305,309,310]. La figure 13, page suivante, représente le dispositif expérimental d'électrotransfert.
L'orientation du champ électrique par rapport à la cellule est aussi un élément important[325]. L'utilisation de deux séries d'impulsions de directions orthogonales permet ainsi d'augmenter l'expression d'un gène rapporteur *in vitro* et *in vivo* dans le muscle tibial cranial de la souris car la zone de perméabilisation cellulaire est augmentée[326,327]. De même, l'utilisation de plusieurs orientations du champ électrique a permis d'optimiser les conditions d'électrotransfert dans l'articulation du genou chez le rat[328].

Au laboratoire, les conditions dites "optimisées" pour le muscle squelettique sont de 8 impulsions de 20 ms et 200 V/cm, à la fréquence de 2 Hz. Ces conditions optimales permettent non seulement d'obtenir un taux élevé d'expression du transgène, à long terme, avec un nombre de fibres transfectées plus élevées, mais aussi de minimiser les dommages tissulaires. En effet, la perméabilisation des cellules électroporées entraîne la diffusion du milieu externe dans les cellules et ainsi la modification du milieu intracellulaire ; le niveau et la durée d'électroperméabilisation doivent donc être optimisés. De plus la production de radicaux libres suite à l'électrotransfert a été décrite [329,330]. Dans le muscle, l'application des impulsions électriques entraîne une inflammation, qui est plus importante en présence d'ADN, mais qui est heureusement réversible en deux semaines[331,332]. Des effets vasculaires dont une vasoconstriction des artérioles ont aussi été décrits suite à l'électrotransfert[333].

Un risque potentiel dans le cadre d'une utilisation clinique de cette méthode est le problème de l'insertion génomique du plasmide ; une étude, réalisée avec des trains d'impulsions électriques a mis en évidence une très faible intégration 6 semaines après électrotransfert[334] ; cependant cette étude n'a pas été confirmée par d'autres, et devrait être réalisée avec d'autres types d'impulsions électriques, dont les conditions "optimales" utilisées pour le muscle squelettique. Une meilleure compréhension du mécanisme de l'électrotransfert est donc indispensable afin d'améliorer la sécurité de la méthode.

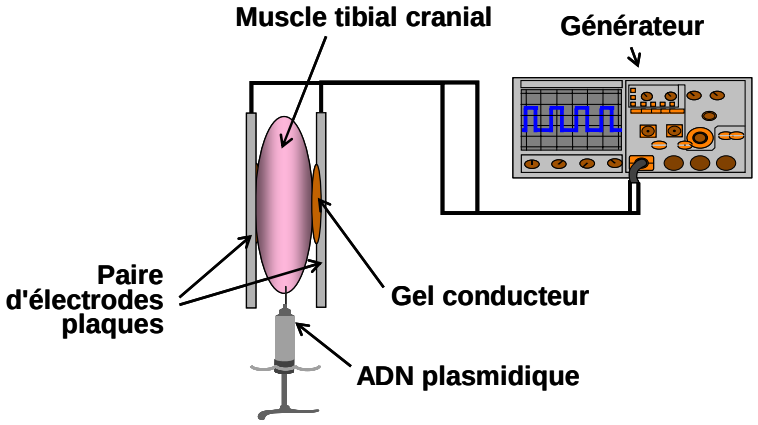


Figure 13 : Montage expérimental de l'électrotransfert intramusculaire. La solution d'ADN plasmidique est injectée dans le muscle tibial cranial de la patte de la souris anesthésiée. Les impulsions électriques sont ensuite appliquées au muscle par deux électrodes plaques placées de part et d'autre de la patte et reliées à un générateur d'impulsions.

IV.2.4-d) Mécanismes de l'électrotransfert

La perméabilisation cellulaire obtenue par application des champs électriques a été évaluée en mesurant la capacité des cellules musculaires à capter une petite molécule hydrophile radioactive : l'EDTA complexé au chrome 51(EDTA-^{51}Cr)[309,335]. Ces études montrent que la captation de la molécule est identique, qu'elle soit injectée 30 secondes avant ou après l'application des impulsions électriques. Par contre, l'ADN doit être présent *in situ* au moment des impulsions électriques pour obtenir une transfection cellulaire efficace. Ceci suggère un effet direct et actif du champ électrique sur les molécules d'ADN pour promouvoir leur entrée dans les cellules. D'où les hypothèses mécanistiques actuelles d'un processus biphasique nécessitant non seulement une perméabilisation cellulaire, mais aussi une électrophorèse de l'ADN. Cette composante électrophorétique de l'électrotransfert d'ADN a été mise en évidence *in vitro* par une expérience sur des monocouches de cellules soumises à l'application d'un champ électrique induisant une électrophorèse vers les cellules ou en sens opposé[336]. Ce phénomène d'électrophorèse peut favoriser l'insertion de l'ADN dans la membrane cellulaire déstabilisée par le champ électrique et/ou favoriser le mouvement de l'ADN dans la cellule perméabilisée.

Cette hypothèse de phénomènes de perméabilisation et d'électrophorèse induits par la procédure d'électrotransfert est confortée par l'étude de combinaisons d'impulsions de faible voltage et de longue durée, non perméabilisantes (LV, dites impulsions électrophorétiques) et d'impulsions de fort voltage et courte durée (HV, dites impulsions perméabilisantes)[337]. Seule la combinaison d'une impulsion HV

suivie d'une impulsion LV permet d'obtenir un transfert de gène efficace, similaire à celui obtenu par utilisation des conditions électriques standards précédemment décrites. La poursuite de ces travaux a permis de confirmer que les impulsions HV n'agissent que sur la perméabilisation cellulaire et non sur l'ADN, et que les impulsions LV ont un effet électrophorétique sur l'ADN[338]. L'importance de la peméabilisation cellulaire a aussi été étudiée par IRM à l'aide d'un complexe du gadolinium comme agent de contraste (gadopentate dimeglumine). Ces études montrent que la zone de perméabilisation au complexe gadopentate dimeglumine est identique à la zone d'expression de l'ADN électrotransféré[339].

Le rôle de la perméabilisation et de l'électrophorèse a été démontré directement à l'échelle de la cellule unique, par microscopie en fluorescence[340]. Ces travaux révèlent que suite à l'application des impulsions électriques, l'ADN s'accumule de manière électrophorétique du côté cathodique de la cellule. Cette accumulation requiert une perméabilisation préalable obtenue à l'aide d'impulsions électriques de durée supérieure à 1 ms. L'interaction ainsi obtenue entre l'ADN et la membrane cellulaire conduit à la formation d'agrégats localisés, insérés dans la membrane cellulaire, qui ne sont pas libérés de la membrane cellulaire par application d'impulsions électriques de polarité inverse.

Par ailleurs, une étude a montré l'importance du métabolisme énergétique afin de permettre le passage de l'ADN à travers la membrane perméabilisée et sa migration jusqu'au noyau[341]. D'autres résultats suggèrent que la captation d'ADN nu repose sur un mécanisme d'endocytose[342]. Cette même étude montre que l'efficacité de transfection ne diminue pas si les impulsions électriques sont appliquées jusqu'à 4 heures après l'injection d'ADN ; ceci suggère l'existence d'un pool d'ADN électrotransférable qui est très stable, même si une grande partie de l'ADN est dégradé dans les premières heures suivant l'injection[343]. D'autres expériences complémentaires permettent de suggérer que l'ADN injecté est rapidement séparé en deux compartiments : dans le premier, la majorité de l'ADN est rapidement dégradée et éliminée (dès 5 minutes après l'injection), et dans le second, une petite partie de l'ADN injecté qui peut être électrotransférée est dégradée plus lentement[344].

IV.2.4-e) Quelques applications thérapeutiques potentielles

L'utilisation la plus accomplie reposant sur le procédé d'électroperméabilisation est l'utilisation de petites molécules comme la bléomycine en électrochimiothérapie, principalement pour le traitement des tumeurs cutanées.

Concernant le transfert de gènes, le champ d'application de l'électrotransfert est vaste[345,346].
L'utilisation du muscle comme organe sécréteur reste à l'heure actuelle la principale utilisation de l'électrotransfert. Ainsi, l'électrotransfert d'un plasmide codant l'érythropoïétine a permis d'augmenter fortement et à long terme l'hématocrite des animaux[347], mais aussi de doubler la durée de vie des érythrocytes, et de rétablir de manière quasi parfaite le déséquilibre entre les chaînes α et β de l'hémoglobine observé dans la β-thalassémie[348]. La sécrétion d'autres protéines a aussi été réalisée avec succès, comme le facteur de croissance HGF (hepatocyte growth factor) dans un modèle d'hépatite aiguë[349], la pro-insuline chez des animaux diabétiques[350], les cytokines/anticytokines dans des modèles de myocardite virale[351,352], d'athérosclérose[353] ou de polyarthrite rhumatoïde[354,355].
L'électrotransfert dans le muscle permet aussi la réalisation de traitements locaux, par exemple grâce à la production locale d'α 2 laminine[356] ou de dystrophine[357] pour le traitement des dystrophies musculaires.

Un domaine d'application important reste la lutte contre le cancer, avec utilisation de gène suicide, de gène codant une cytokine stimulant le système immunitaire, ou de gène suppresseur de tumeurs[313,358,359]. L'électrotransfert est alors principalement réalisé dans le muscle, la tumeur ou la peau.

L'utilisation de l'électrotransfert dans le domaine de la vaccination représente une alternative intéressante aux méthodes classiques. Les organes cibles sont alors le muscle ou la peau, et permettent d'obtenir une réponse immune efficace[360,361].

Enfin, l'électrotransfert est un outil méthodologique utile, qui permet l'étude *in vivo* de l'expression d'un gène et de sa fonction dans un tissu donné. Cette stratégie s'est avérée intéressante en biologie du développement chez les vertébrés[319], mais aussi pour identifier la fonction d'un gène en l'invalidant chez des embryons de zebrafish[362].

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Nous venons de voir que l'inflammation est un processus de défense qui peut devenir délétère dans de nombreuses pathologies. Le TNF-α apparaît une cible de choix pour définir des traitements contre des processus inflammatoires dérégulés. Actuellement, de nombreuses stratégies anti-TNF sont développées, visant à inhiber les effets pro-inflammatoires et destructeurs du TNF en agissant sur les différentes étapes qui vont de la transcription du gène de la cytokine à sa fixation sur son récepteur membranaire. Les formes pharmaceutiques actuelles (anticorps anti-TNF, récepteurs solubles) sont efficaces, mais peuvent entraîner des effets secondaires indésirables. De plus, la production de ces protéines en quantité suffisante est coûteuse. Malgré le développement de différentes formes d'inhibiteurs du TNF-α, visant à optimiser la stabilité des protéines recombinantes, la durée de vie de ces protéines *in vivo* reste courte, et permet seulement d'obtenir un effet à court terme qui nécessite des injections répétées.

Dans ce contexte, la thérapie génique semble une stratégie thérapeutique prometteuse qui permet d'obtenir des concentrations stables et éventuellement contrôlables de protéine. Parmi les différents vecteurs de thérapie génique que nous venons de présenter, notre choix s'est porté sur une méthode physique de transfert de gène, l'électrotransfert, intéressante de part sa sûreté (méthode non virale, transfert d'un plasmide seul, peu ou pas d'intégration dans le génome) et son efficacité. Nous avons choisi, dans l'ensemble de notre travail, de cibler le TNF-α par électrotransfert du gène codant le récepteur soluble du TNF-α (hTNFR-Is).

1. Construction et validation *in vitro* des vecteurs

Notre objectif était tout d'abord de construire puis de caractériser trois variants du récepteur soluble de type I du TNF-α humain (figure 14) :

- Une forme monomérique, identique au récepteur soluble physiologique
- Une forme dimérique, dans laquelle deux fragments hTNFR-Is sont reliés par un espaceur polyglycine
- Une forme chimérique, dans laquelle deux hTNFR-Is sont associés au fragment constant de l'immunoglobuline G1 murine, afin d'accroître la stabilité systémique de la protéine transgénique

L'efficacité de neutralisation du TNF-α par chacun des ces trois variants a été évaluée *in vitro*.

2. Validation de la méthode d'électrotransfert *in vivo* par ces vecteurs

Lorsque nous avons commencé notre travail, la technique "classique" d'électrotransfert intramusculaire était déjà développée au laboratoire. Par cette méthode, nous avons voulu évaluer le pouvoir de neutralisation du TNF-α de ces variants, produits *in vivo* par le muscle transfecté. Nous nous sommes ensuite proposé de caractériser leur expression en posant trois questions distinctes :

- Quel est le profil cinétique et la relation dose de plasmide électrotransféré/taux de protéine détecté *in vivo* (local et systémique) en fonction du variant étudié ?
- Les plasmides électrotransférés sont-ils disséminés à travers l'organisme après électrotransfert ?
- Quelle est la réponse immune générée par l'introduction de ces plasmides dans l'organisme ?

3. Application thérapeutique systémique de l'électrotransfert intramusculaire

Après validation et caractérisation de la technique d'électrotransfert i.m avec ces trois variants du hTNFR-Is, permettant une approche systémique, notre objectif a été d'évaluer l'efficacité thérapeutique de cette stratégie dans deux modèles murins de pathologies inflammatoires : l'arthrite expérimentale au collagène, modèle de polyarthrite rhumatoïde, et un modèle de traumatisme crânien diffus.

4. Approche locale par électrotransfert

Dans le but d'obtenir des taux locaux élevés de protéine dans un compartiment restreint d'une part, et d'éviter d'autre part des effets indésirables possibles de la protéine transgénique liés à un taux systémique trop important, nous avons ensuite souhaité développer des méthodes alternatives permettant un transfert de gène directement au sein du tissu inflammatoire, par voie locale. Nos objectifs étaient donc :

- Mettre au point la technique d'électrotransfert dans l'articulation du genou chez la souris et dans le muscle ciliaire de l'œil chez le rat.
- Etudier la localisation de l'expression ainsi obtenue pour chacun des trois variants du hTNFR-Is.
- Réaliser une étude cinétique et analyser la relation dose de plasmide électrotransféré/taux de protéine détectée dans les compartiments local et systémique après électrotransfert local.

Après validation et caractérisation de ces techniques d'électrotransfert local, notre dernier objectif était d'évaluer le potentiel thérapeutique des variants, dans l'arthrite expérimentale au collagène par électrotransfert intra-articulaire, et dans l'uvéite expérimentale aux endotoxines par électrotransfert intra-oculaire.

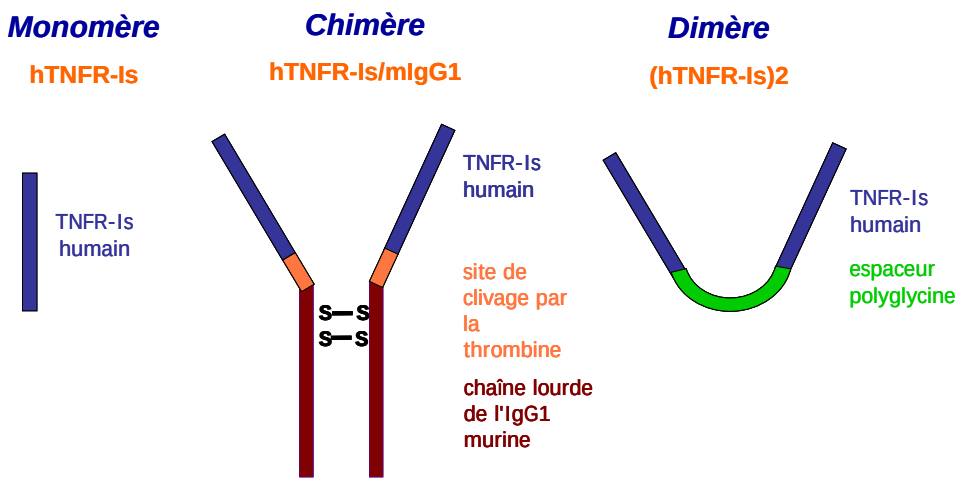


Figure 14 : Représentation schématique des trois variants du récepteur soluble du TNF-α humain étudiés dans nos travaux.

MATERIEL ET METHODES

I. Plasmides et biologie moléculaire

I.1. Plasmides

I.1.1 *pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2, pCOR Vide*

I.1.1-a) pCOR Vide

pCOR Vide est un vecteur de clonage de la société Aventis-Gencell. Il comporte, de part et d'autre de son site de clonage, le promoteur du cytomégalovirus humain flanqué de l'enhancer (hCMV E/P) et le site de polyadénylation tardif du virus simiens 40 (SV 40 late polyA signal)[363].

I.1.1-b) pCOR hTNFR-Is

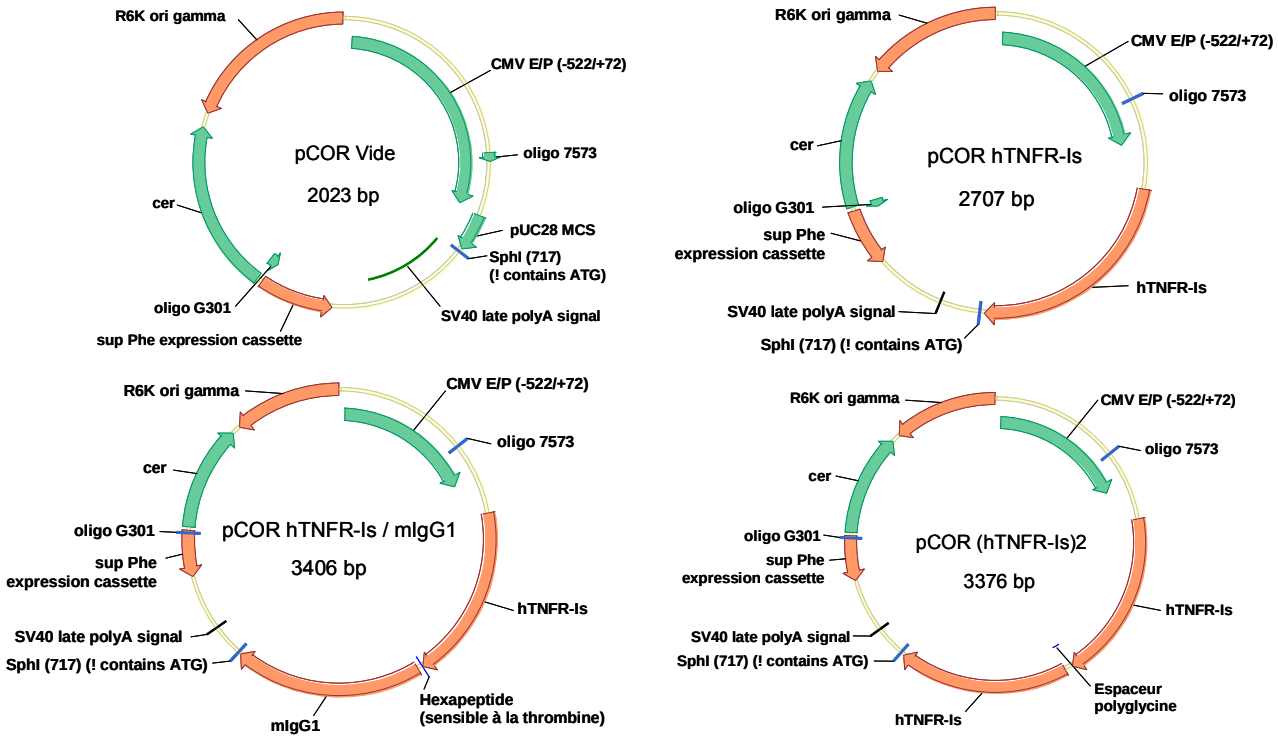
Le plasmide pCOR hTNFR-Is (2707 bp) contient l'ADNc du récepteur soluble de type I du TNF-α humain, et code la forme monomérique du hTNFR-Is. Il a été obtenu par digestion du plasmide pCR2.1 hTNFR-Is par les enzymes *Kpn*I et *Xho*I et ligation de l'insert ainsi obtenu dans le vecteur pCOR Vide, digéré par les mêmes enzymes.

I.1.1-c) pCOR hTNFR-Is/mIgG1

Le plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1 (3406 bp) code une protéine de fusion associant le récepteur soluble de type I du TNF-α humain au fragment constant de l'IgG1 murine. Il a été obtenu par digestion du plasmide pCR2.1 hTNFR-Is/mIgG1 par les enzymes *Kpn*I et *Xho*I et ligation de l'insert ainsi obtenu dans le vecteur pCOR Vide, digéré par les mêmes enzymes.

I.1.1-d) pCOR (hTNFR-Is)2

Le plasmide pCOR (hTNFR-Is)2 (3376 bp) contient deux segments d'ADNc du récepteur soluble de type I du TNF-α humain reliés par un espaceur polyglycine $(Ser(Gly)_4)_2$, et code un dimère de TNFR-Is. Il a été obtenu par digestion du plasmide pCR2.1 (hTNFR-Is)2 par les enzymes *Kpn*I et *Xho*I et ligation de l'insert ainsi obtenu dans le vecteur pCOR Vide, digéré par les mêmes enzymes.



I.1.2 *pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2, pVAX2*

I.1.2-a) pVAX2

pVAX2 est un vecteur de clonage issu du vecteur commercial pVAX1 (Invitrogen), dans lequel le promoteur a été remplacé par celui du plasmide pCMVβ (Clontech).

I.1.2-b) pVAX2 hTNFR-Is

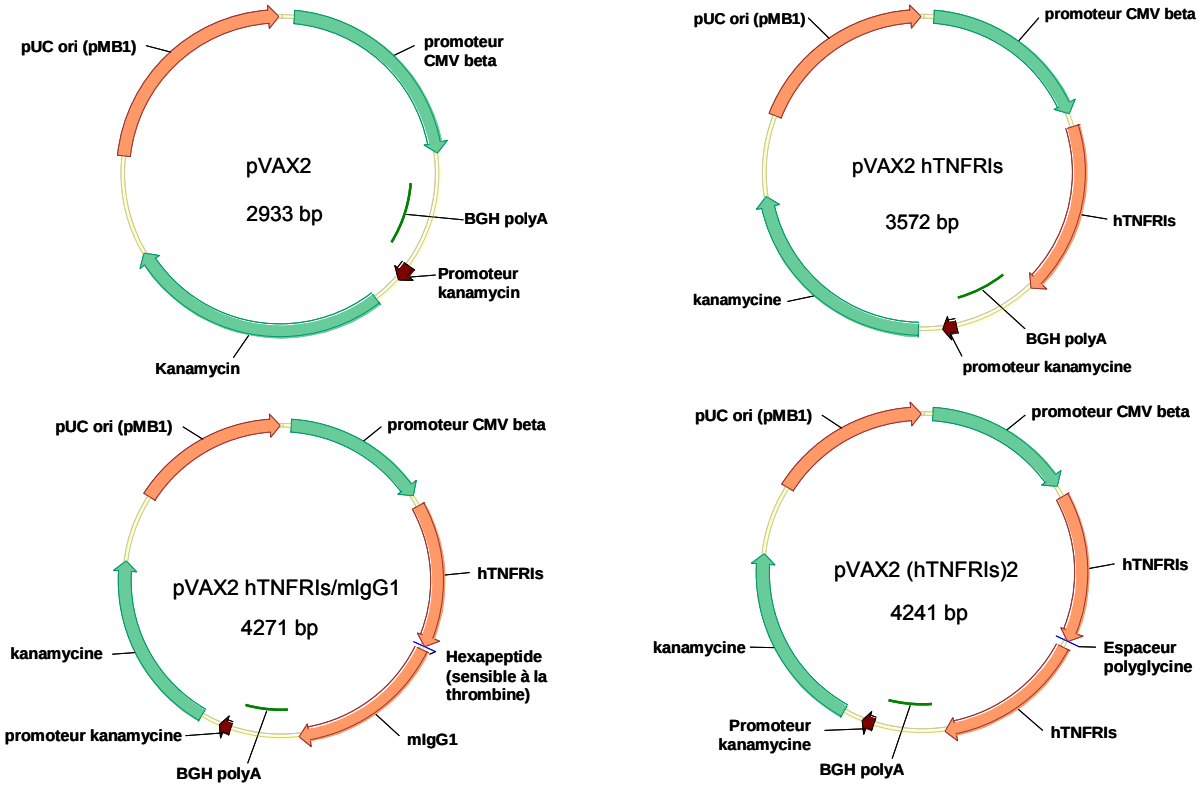
Le plasmide pVAX2 hTNFR-Is (3572 bp) contient l'ADNc du récepteur soluble de type I du TNF-α humain, et code la forme monomérique du TNFR-Is. Il a été obtenu par digestion du plasmide pCOR hTNFR-Is par les enzymes *Spe*I et *Xho*I et ligation de l'insert ainsi obtenu dans le vecteur pVAX2, digéré par les mêmes enzymes.

I.1.2-c) pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1

Le plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (4272 bp) code une protéine de fusion associant le récepteur soluble de type I du TNF-α humain au fragment constant de l'IgG1 murine. Il a été obtenu par digestion du plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1 par les enzymes *Spe*I et *Xho*I et ligation de l'insert ainsi obtenu dans le vecteur pVAX2, digéré par les mêmes enzymes.

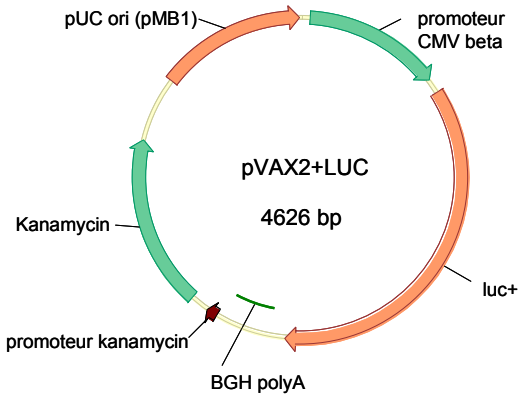
I.1.2-d) pVAX2 (hTNFR-Is)2

Le plasmide pVAX2 (hTNFR-Is)2 (4241 bp) contient deux segments d'ADNc du récepteur soluble de type I du TNF-α humain reliés par un espaceur, et code un dimère de hTNFR-Is. Il a été obtenu par digestion du plasmide pCOR (hTNFR-Is)2 par les enzymes *Spe*I et *Xho*I et ligation de l'insert ainsi obtenu dans le vecteur pVAX2, digéré par les mêmes enzymes.



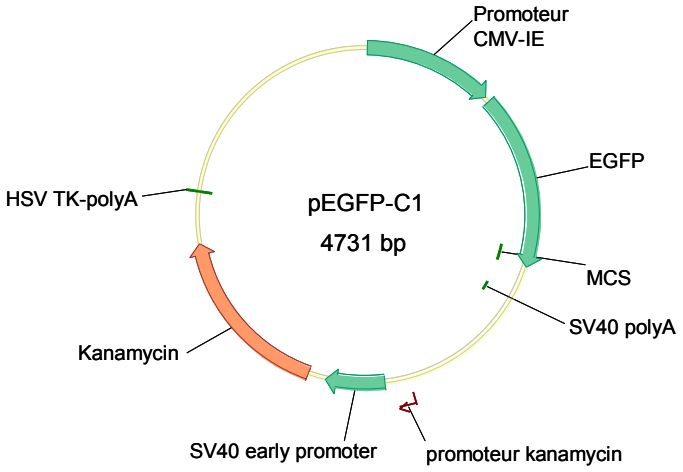
I.1.3 *pVAX2 luc*

Le plasmide pVAX2 luc code une protéine luciférase firefly cytosolique. Il a été obtenu par digestion du plasmide pCOR-luc (pXL3031, Aventis) par les enzymes *Hind*III et *Xba*I, suivie d'un traitement à l'enzyme de Klenow. Le fragment à bouts francs obtenu a été purifié sur gel d'agarose puis inséré dans le plasmide pVAX2 digéré par *Eco*RV et déphosphorylé à l'aide d'une phosphatase alcaline (Roche).



I.1.4 *pEGFP-C1*

Le plasmide pEGFP-C1 (4,7 kb, Clontech) est un plasmide commercial contenant le gène de la Green Fluorescent Protein (GFP) sous contrôle d'un promoteur CMV.



I.1.5 *pCDNA3.1 hygromycine*

Le plasmide pCDNA3.1 hygromycine (5601 bp, Invitrogen) contient le gène de résistance à l'hygromycine.

I.1.6 *Préparation des solutions d'ADN plasmidique*

Les solutions d'ADN plasmidiques sont préparées à l'aide des kits Endofree Mega ou Giga Kit (Qiagen) selon le protocole du fournisseur.

I.2. Extraction d'acides nucléiques

I.2.1 *Extraction des ARN totaux*

L'extraction des ARN totaux était réalisée à partir de culots cellulaires de lymphocytes extraits de rate de souris immunostimulée ou de culot de cellules HeLa (cellules humaines de carcinome cervical, 5.10^6 cellules environ). Le culot cellulaire était tout d'abord lysé dans 1 mL de Trizol LS reagent (Invitrogen). L'ARN total était extrait par une méthode phénol/chloroforme, selon les instructions du fournisseur. Brièvement, l'addition de chloroforme (200 µL/mL de trizol) suivie d'une centrifugation (15 minutes, 12000g, 4°C) permettait la séparation de la phase aqueuse contenant les ARN, de l'interface et de la phase organique, contenant les ADN et les protéines. Les ARN étaient ensuite précipités par addition d'éthanol (0,5 mL/mL de trizol) ; le culot était lavé à l'éthanol 75%, puis repris dans 30 µL d'eau. Les ARN ainsi obtenus étaient conservés à –80°C.

I.2.2 *Extraction d'ADN génomique*

L'ADN génomique était extrait à partir de cultures cellulaires (10^7 cellules) ou de divers organes (25mg) prélevés sur la souris (muscle, foie, rein, rate, cœur, poumon, cerveau, gonade) à l'aide du kit QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen), selon le protocole du fournisseur. Les quantités d'ADN obtenues étaient déterminées par mesure de l'absorbance à 260 nm.

I.3. RT et PCR

I.3.1 *Reverse transcription des ARNm-Amplifcation par PCR*

Afin d'obtenir les gènes du TNFR-Is humain, du fragment constant de l'IgG1 murine, et les différents variants souhaités, nous avons réalisé des transcriptions inverses (RT) suivies de réactions de polymérisation en chaîne (PCR) sur les ARN totaux précédemment extraits.

Séquences des amorces utilisées

Amorce	Séquence (5' → 3')
TNFR5'	agcattctagaTCTGGCATGGGCCTCTCCACC
TNFR3'	actggctcgagctaTGTGGTGCCTGAGTCCTC
IgG5'-Thr	ctggttccgcgtggatccGTGCCCAGGGATTGTGGT
IgG3'	actggctcgagTCATTTACCAGGAGAGTG
TNFR3'-Thr	ggatccacgcggaaccagTGTGGTGCCTGAGTCCTC
TNFR3'-PG	actaccaccacctccggaaccaccaccaccTGTGGTGCCTGAGTC
TNFR5'-PG	ggtggtggtggttccggaggtggtggtagtTCTGGCATGGGCCTC
pCOR5'	ACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCA
pCOR3'	TTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATC
Actine5'	TCTTGTGTGTGACAACGGCTC
Actine3'	CAAACATGATTTGAGTCATCTTCTC

I.3.1-a) Obtention de l'ADNc hTNFR-Is

Le gène du récepteur soluble de type I du TNF-α humain était obtenu par RT à partir de 5 µg d'ARN totaux isolés des cellules HeLa, suivant la publication de Peppel *et al*[364]. L'amplification par PCR était ensuite réalisée à l'aide des amorces TNFR5' et TNFR3' selon les conditions suivantes : une première dénaturation de 5 minutes à 95°C suivie de 5 cycles comportant trois étapes : dénaturation de l'ADN pendant 1 min à 95°C ; hybridation pendant 1 min à 50°C ; élongation pendant 1 min à 72°C. Ensuite, 30 cycles étaient réalisés : 1 min à 95°C ; 1 min à 60°C ; 1 min à 72°C. Une extension finale de 15 minutes à 72°C était ensuite réalisée. Le fragment ainsi obtenu contenait la totalité du cadre de lecture (open reading frame) du hTNFR-Is suivi d'un codon stop. Il a été sous-cloné dans le vecteur pCR2.1 (Invitrogen), donnant le plasmide pCR2.1 hTNFR-Is.

I.3.1-b) Obtention de l'ADNc mIgG1

Le gène du fragment constant de l'immunoglobuline G1 murine était obtenu par RT à partir de 5µg d'ARN totaux isolés des lymphocytes de rates de souris immunostimulées. L'amplification par PCR était ensuite réalisée à l'aide des amorces IgG5'-Thr et IgG3' dans les conditions suivantes : une première dénaturation de 5 minutes à 95°C suivie de 30 cycles comportant trois étapes : dénaturation de l'ADN pendant 1 min à 95°C ; hybridation pendant 1 min à 50°C ; élongation pendant 1 min à 72°C. Une extension finale de 15 minutes à 72°C était ensuite réalisée. Ce fragment était sous-cloné dans le vecteur pCR2.1, donnant le plasmide pCR2.1 mIgG1 5'Thr.

I.3.1-c) Obtention de l'ADNc hTNFR-Is/mIgG1

Le gène du hTNFR-Is avec la séquence du site de clivage de la thrombine en 3' était amplifié en PCR à l'aide des amorces TNFR5' et TNFR3'-Thr et du plasmide pCR2.1 hTNFR-Is dans les conditions suivantes : une première dénaturation de 5 minutes à 95°C suivie de 30 cycles comportant trois étapes; dénaturation de l'ADN pendant 1 min à 95°C ; hybridation pendant 1 min à 55°C ; élongation pendant 1 min à 72°C. Une extension finale de 15 minutes à 72°C était ensuite réalisée. De même, le gène du mIgG1 avec la séquence du site de clivage de la thrombine en 5' était amplifié en PCR à l'aide des amorces IgG5'-Thr et IgG3' et du plasmide pCR2.1 mIgG1 5'Thr dans les conditions décrites précédemment. Ces deux fragments de PCR étaient ensuite rassemblés dans une nouvelle PCR utilisant les amorces TNFR5' et IgG3', afin d'associer les gènes du hTNFR-Is et de l'IgG1 par l'intermédiaire du gène du site de clivage par la thrombine. Les cycles réalisés étaient : une première dénaturation de 5 minutes à 95°C suivie de 30 cycles comportant trois étapes : dénaturation de l'ADN pendant 1 min à 95°C ; hybridation pendant 1 min à 60°C ; élongation pendant 1 min à 72°C. Une extension finale de 15 minutes à 72°C était ensuite réalisée. Ce fragment de PCR était alors sous-cloné dans le vecteur pCR2.1, donnant le plasmide pCR2.1 hTNFR-Is/mIgG1.

I.3.1-d) Obtention de l'ADNc (hTNFR-Is)2

Le but de cette construction était d'obtenir un transgène codant deux hTNFR-Is séparés par un espaceur polyglycine de 10 acides aminés $(Ser(Gly)_4)_2$.
Pour obtenir le fragment (hTNFR-Is)2, le gène hTNFR-Is était amplifié par PCR avec des amorces TNFR5' et TNFR3'-PG, et aussi avec les amorces TNFR5'-PG et TNFR3' selon les conditions : une première dénaturation de 5 minutes à 95°C suivie de 5 cycles : 1 min à 95°C; 1 min à 48°C; 1 min à 72°C, puis 30 cycles : 1 min à 95°C; 2 min à 72°C. Les deux fragments ainsi amplifiés étaient sous-clonés dans le vecteur pCR2.1, donnant pCR2.1 hTNFR-Is5'-PG (codon stop éliminé) et pCR2.1 hTNFR-Is3'-PG (ajout d'un codon stop). Le fragment de digestion *Bsp*EI-*Not*I de pCR2.1 hTNFR-Is3'PG était ensuite inséré dans le vecteur pCR2.1 hTNFR-Is5'PG digéré par les même enzymes, conduisant au plasmide pCR2.1 (hTNFR-Is)2.

I.3.2 *Etude de dissémination du vecteur électrotransféré i.m par PCR*

Les PCR effectuées visaient à amplifier une séquence des plasmides pCOR, en utilisant des amorces spécifiques de ce plasmide. Le fragment amplifié était donc commun à toutes les constructions plasmidiques. Les analyses étaient réalisées avec le plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1, dont la séquence amplifiée par PCR à l'aide des amorces spécifiques (pCOR5' et pCOR3') est caractérisée par la longueur du fragment : 1576 bp. L'amplification du gène de l'actine (bande à 450 bp, amorces Actine5' et Actine3') constituait le contrôle positif de l'extraction d'ADN.

Le mélange réactionnel comprenait l'ADN génomique (500ng) dans un volume final de 50 µL contenant les deux amorces spécifiques du pCOR ou de l'actine (0,5 µM), 25 µL du mélange HotStar Master Mix (Qiagen) constitué de Hot Star Taq polymérase (2,5 U), son tampon, MgCl2 (1,5 mM) et 200 µM de chaque dNTP.
Les conditions d'amplification étaient programmées sur l'appareil Techgene (Techne) de la façon suivante : une première dénaturation de 15 minutes à 95°C, suivie de 35 cycles : 1 minute à 95°C, 1 minute à 58°C, 1minute 30 secondes à 72°C, puis d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

II. Préparation des animaux

II.1. Souris

Des souris DBA/1 (H-2^q) (Harlan, Grande Bretagne), souche dont les mâles sont sensibles à l'AEC, ainsi que des souris SWISS et C57Bl/6 (Janvier, France), âgées de 7 à 9 semaines au moment des expériences, étaient utilisées.
Les souris DBA/1 étaient anesthésiées par injection intrapéritonéale d'avertine (12,5 g de tribromoéthanol + 25 mL de 2-méhthyl-butan-2-ol + 1 L d'eau stérile, conservé dans l'obscurité à +4°C), à raison de 0,5 mL pour une souris de 25 g. Les souris SWISS et C57Bl/6 étaient anesthésiées par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (10 mg/mL) et de xylazine (1 mg/mL), à la dose de 0,1 mL/10 g.
Une fois les animaux endormis, leurs pattes postérieures ou leurs genoux étaient rasés à l'aide d'une tondeuse (Cordless rechargeable animal trimer, series 8900, WHAL U.S.A.).

II.2. Rats

Des rats Lewis femelles, d'âge 6-7 semaines et de masse 150-200g (IFFA CREDO, France) étaient utilisés.
Les rats étaient anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital (40mg/kg).

III. Électrotransfert *in vivo*

III.1. Electrotransfert intramusculaire

30 µL de plasmide en solution de NaCl 150 mM étaient injectés longitudinalement dans le muscle tibial cranial de la souris à l'aide d'une seringue hamilton. La patte injectée était ensuite recouverte par un gel de conduction (Ten20, Pactronic) et, environ trente secondes après l'injection d'ADN, des impulsions électriques étaient appliquées à l'aide de deux électrodes plates de 1 cm sur 2 cm, en acier inoxydable, placées de chaque côté de la patte. Les impulsions électriques unipolaires carrées

étaient délivrées par un électropulsateur BTX ECM 830, et l'intensité du champ électrique appliqué était calculée en fonction de l'écartement des électrodes afin d'obtenir une valeur effective de 200 V/cm. Tous les électrotransferts ont été effectués dans les conditions dites optimisées : 8 impulsions carrées unipolaires d'une durée de 20 ms, à la fréquence de 2 Hz, et d'une intensité effective de 200 V/cm [309,365].

III.2. Electrotransfert intra-articulaire

10 µL de plasmide en solution de NaCl 150 mM étaient injectés en intra-articulaire, dans le genou de la souris, à l'aide d'une seringue hamilton (10 µL avec une aiguille intégrée de 32G). Le genou injecté était ensuite recouvert par un gel de conduction (Ten20, Pactronic) et, environ trente secondes après l'injection d'ADN, des impulsions électriques étaient appliquées à l'aide de deux électrodes plates fines de 1cm sur 3 mm, en acier inoxydable, placées de chaque côté du genou (direction antérieure-postérieure), et toujours dans la même orientation (pôle positif de l'électrode sur la rotule). Les impulsions électriques unipolaires carrées étaient délivrées par un électropulsateur BTX ECM 830, et l'intensité du champ électrique appliqué était calculée en fonction de l'écartement des électrodes afin d'obtenir une valeur effective de 250 V/cm. Tous les électrotransferts ont été effectués dans les mêmes conditions électriques : 12 impulsions carrées unipolaires d'une durée de 20 ms, à la fréquence de 2 Hz, et d'une intensité effective de 250 V/cm (communication personnelle de Florence Apparailly).

III.3. Electrotransfert intra-oculaire, dans le muscle ciliaire

L'ensemble de ces expériences a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Francine Behar-Cohen (INSERM U598) à la Fondation Rotschild. Les injections étaient réalisées dans le muscle ciliaire de l'œil, à l'aide d'une seringue à insuline (aiguille 30G, volume 100 µL), dans un volume de 10 µL.
La cathode utilisée était un fil d'iridium/platine de 500 µm de diamètre, dénudé sur 2 mm, et recouvert de silicone sur le reste de sa longueur afin de l'isoler électriquement. Elle était placée dans le canal réalisé avec l'aiguille injectrice. L'électrode de retour était un feuillet de platine de 5 mm sur 2,5 mm, ajusté à la surface de l'œil, et placé sur la sclère.

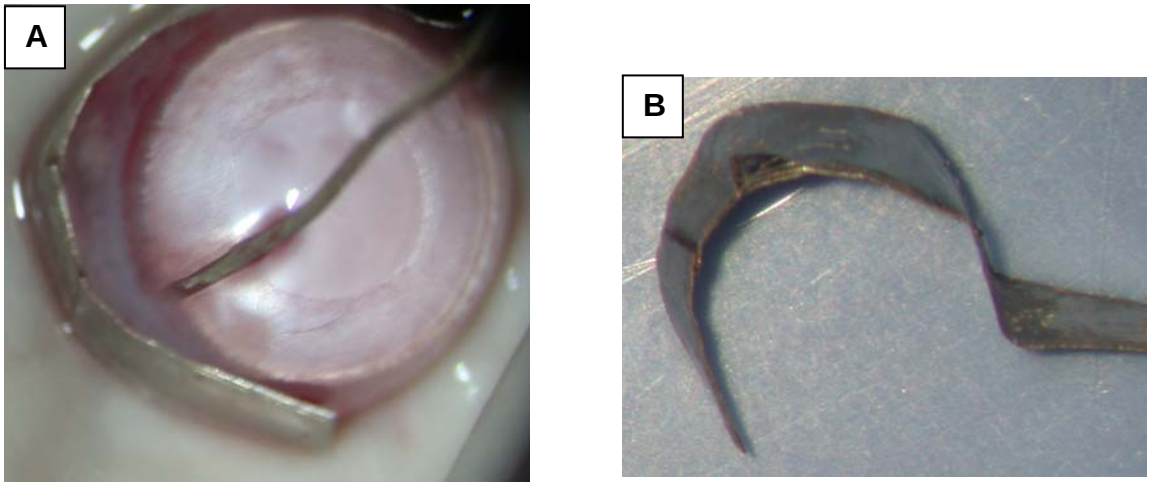


Figure 15 : Dispositif d'électrotransfert dans l'œil.
A : Placement des électrodes internes et externes durant la procédure d'électrotransfert.
B : Electrode de retour péri-oculaire annulaire.

Les paramètres utilisés étaient : 8 impulsions de 20 ms, à la fréquence de 5 Hz, et d'intensité 10V (soit 200V/cm).

IV. Transfert de gène par cellules autologues

IV.1. Culture cellulaire

Les cellules DBA/Tst[366] sont des fibroblastes de souris immortalisés cultivés dans un milieu RPMI 1640 avec Glutamax (GibcoBRL), 1% d'antibiotiques (pénicilline 10000 U/mL et streptomycine 10000 µg/mL, Eurobio) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF, GibcoBRL), qui constituent le milieu complet.
Les cellules étaient cultivées à 37 °C dans une étuve à 5% de CO_2.

IV.2. Transfection transitoire

Ces transfections visaient à contrôler la fonctionnalité des plasmides codants le hTNFR-Is, et à évaluer la sécrétion de hTNFR-Is obtenue.
2.10^5 cellules étaient ensemencées dans 2 mL de milieu complet dans des plaques de culture 6 puits, et étaient mises en incubation pendant une nuit à 37°C.
Pour la transfection, deux solutions étaient préparées : l'une avec 3 µg d'ADN dilué dans 100 µL de milieu Opti-MEM (Invitrogen), l'autre avec 9 µL de Lipofectamine à 2mg/mL (lipide cationique, Invitrogen) dans 100 µL de milieu Opti-MEM.
Les deux solutions étaient ensuite mélangées goutte à goutte et le mélange était mis en incubation à température ambiante pendant 30 à 45 minutes, afin de permettre la formation de complexes ADN-lipide cationique. Après addition de 1,3 mL de milieu RPMI seul (GibcoBRL) dans chaque tube contenant les complexes ADN-lipide, la solution était ajoutée sur les cellules préalablement lavées avec du milieu RPMI seul. Les cellules étaient mises en incubation 5 heures à 37°C puis le milieu était remplacé par 2 mL de milieu complet.
Les surnageants de culture étaient prélevés 48 heures après la transfection puis étaient conservés à –20°C ou directement utilisés pour les dosages ELISA.

IV.3. Etablissement de la lignée stable DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1

Afin d'utiliser une approche par thérapie cellulaire *via* greffe de cellules autologues, nous avons établi une lignée stable de fibroblastes DBA/Tst exprimant de manière constitutive la protéine de fusion hTNFR-Is/mIgG1.
Une manipulation préliminaire était effectuée afin de déterminer la quantité minimale d'hygromycine (GibcoBRL) qui induit la mort de toutes les cellules DBA/Tst. Dans ce but, les cellules étaient cultivées en présence de différentes concentrations d'antibiotique, de 5 à 80 µg/mL.
La transfection était ensuite réalisée selon le même protocole que pour une transfection transitoire. Seule la solution contenant l'ADN différait ; en effet, le plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1 ne portant pas de gène de résistance à un antibiotique, une co-transfection était effectuée avec 0,4 µg de pCDNA3.1 hygromycine et 2,6 µg de pCOR hTNFR-Is/mIgG1, soit un ratio molaire de 1/10. Les cellules étaient alors sélectionnées pendant un mois de culture en présence d'hygromycine à 45 µg/mL. Les clones exprimant les plus grandes quantités de TNFR-Is (par ELISA) étaient ensuite sélectionnés.

IV.4. Injection de cellules autologues

Afin d'étudier la capacité de production des cellules de la lignée autologue DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1, ainsi que leur potentialité thérapeutique, les cellules en culture étaient comptées puis centrifugées 5 minutes à 600g. Elles étaient ensuite reprises à la concentration de 8 millions de cellules dans 100 µL de milieu de culture. 100 µL de cellules étaient alors injectées en sous-cutané, à la base du dos, chez la souris DBA/1, à l'aide d'une seringue 1 mL équipée d'une aiguille 26G.

V. Prélèvements et préparation des échantillons

Les souris étaient sacrifiées par dislocation cervicale ou surdose d'anesthésique (trois fois la dose utilisée pour l'anesthésie). Les rats étaient sacrifiés par overdose de pentobarbital.

V.1. Prélèvement de sang

Le sang était prélevé sur tubes sec au niveau du sinus rétro-orbital ou par ponction intra-cardiaque lorsque les souris devaient être sacrifiées. Le sang était laissé à température ambiante jusqu'à coagulation (environ une heure), puis les tubes étaient centrifugés à 2 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le sérum était alors récupéré puis stocké à –20°C.

V.2. Prélèvement de muscle

Les muscles tibiaux craniaux étaient prélevés sur tube sec et conservés à -20°C jusqu'au jour du dosage. Avant le dosage, 1 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline) était ajouté à chaque tube. Les muscles étaient alors broyés à l'aide d'un ultra-turrax (Diax 600, Heidolph). Entre chaque tube, la tige était rincée et les débris musculaires restants étaient enlevés à l'aide d'une pince. Entre chaque groupe de muscles correspondant à une condition particulière, la tige était entièrement démontée et rincée soigneusement. Les tubes étaient ensuite centrifugés à 3 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Les surnageants étaient récupérés et utilisés directement pour le dosage.
La concentration totale de protéine contenue dans chaque lysat était évaluée par mesure de l'absorbance à 280 nm.

V.3. Prélèvement de peau

Les fragments de peau étaient prélevés puis broyés dans un potter avec 400 µL de tampon de lyse (Tris 0,25 mM, pH=8). Après agitation au vortex des broyats tissulaires, une série de cinq congélations (azote liquide)/décongélations (37°C) était réalisée. Les débris cellulaires étaient ensuite éliminés par une centrifugation de 10 minutes à 12 000 g. Les surnageants étaient récupérés et conservés à –20°C.
La concentration totale de protéine contenue dans chaque lysat était évaluée par mesure de l'absorbance à 280 nm.

V.4. Prélèvement du genou

Après sacrifice de la souris, la peau de la patte était retirée, la rotule et la synoviale étaient prélevées, ainsi que les têtes du fémur et du tibia. Les prélèvements étaient conservés à -80°C jusqu'à analyse. Dans le cas où le genou a été transfecté par un plasmide codant une protéine soluble, le prélèvement était mis en culture dans 200µL de RPMI seul pendant 24h à 37°C, puis le surnageant était récupéré et conservé à -20°C.

V.5. Prélèvement des yeux

Les prélèvements effectués dans l'œil étaient l'humeur aqueuse, le muscle ciliaire, ou le globe oculaire dans le cas d'études histologiques.

Les humeurs aqueuses de deux yeux de même score clinique dans le modèle expérimental d'uvéite étaient rassemblées pour les dosages.

V.6. Prélèvement de cerveau

Après sacrifice de la souris, le cerveau était disséqué sur une plaque réfrigérée. Une carotte de tissu de 4mm de diamètre était prélevée au niveau de la zone de la lésion et de la zone controlatérale à l'aide d'un emporte-pièce.
Pour certaines conditions, les souris anesthésiées étaient perfusées avec 100 mL de sérum physiologique, avant sacrifice et prélèvement des carottes de cerveau.

V.7. Récupération de lymphocytes activés dans la rate

V.7.1 *Stimulation immune*

Ce protocole visait à immuniser des souris C57/Bl6 afin que leurs lymphocytes activés produisent des immunoglobulines G1 contre l'ovalbumine. On pouvait alors récupérer les rates de ces souris qui contiennent un nombre important de lymphocytes produisant des immunoglobulines G1 et en extraire les ARN totaux afin de récupérer l'ARNm codant pour le fragment constant de l'IgG1.
Pour chaque souris à immuniser, il fallait préparer 100 µL d'émulsion contenant 60 µL d'adjuvant incomplet de Freund et 40 µL de la solution d'antigène (ici l'ovalbumine) à 2,5 mg/mL. La solution obtenue était ensuite mélangée dans deux seringues en verre reliées par un tuyau, en faisant passer l'émulsion d'une seringue à l'autre jusqu'à obtention d'un mélange homogène. 100 µL de cette émulsion étaient injectés à chaque souris en intrapéritonéal et un rappel était effectué une semaine plus tard. Les rates étaient ensuite prélevées douze jours après la première injection.

V.7.2 *Récupération des lymphocytes*

Les rates étaient ensuite traitées individuellement. Chaque rate était placée dans un tamis cellulaire 100µm, dans une boîte de Pétri contenant du milieu RPMI. A l'aide d'un piston de seringue 5 mL, la rate était écrasée et filtrée à travers le tamis, tout en restant dans le milieu RPMI. Le filtrat était homogénéisé à l'aide d'une pipette de 10 mL, placé dans un falcon de 50 mL et complété à 25 mL avec du milieu RPMI. Après centrifugation 5 minutes à 4°C à la vitesse de 300g, le culot était repris dans 5 mL de tampon ACK (NH_4Cl 0,15M, KCO_3 1M, Na_2EDTA 0,1M, pH 7,2-7,4, filtré à 0,2 µm) et mis en incubation 2 minutes à température ambiante. 25 mL de RPMI étaient ensuite ajoutés afin de stopper la lyse des érythrocytes, et deux lavages étaient effectués, avec 25 mL de RPMI. Le culot cellulaire était ensuite directement utilisé pour l'extraction des ARN totaux.

VI. Dosages et mesure d'activité biologique

VI.1. Dosage par ELISA du hTNFR-Is, mTNF-α, mIL-1β et rTNF-α

Les dosages du TNFR-Is humain, du TNF-α murin, de l'IL-1β murine et du TNF-α de rat étaient effectués dans les surnageants de cellules transfectées ou d'articulation, les lysats tissulaires, l'humeur aqueuse (œil) ou dans le sérum. Le dosage était effectué par ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay), à l'aide des kits DuoSet (R&D Systems) correspondants, selon les recommandations du fabricant.
Les seuils de détection des dosages utilisés étaient : 12,5 pg/mL pour le TNFR-Is humain, 31,2 pg/mL pour le TNF-α murin, 15,6 pg/mL pour l'IL-1β murine, et 62,5 pg/mL pour le TNF-α de rat.

La concentration en protéine de chaque échantillon était déterminée, en pg/mL, par mesure de l'absorbance à 450 nm au spectrofluorimètre BioKinetics reader EL340 (Bio-tek Instruments) et à l'aide d'une gamme étalon réalisée avec la protéine recombinante correspondante.
Les concentrations de variants de hTNFR-Is étaient exprimées en équivalent de monomère hTNFR-Is recombinant.

VI.2. Evaluation de l'activité biologique du hTNFR-Is

L'activité biologique des TNFR-Is contenus dans les surnageants de culture des cellules DBA/Tst transfectées par les plasmides pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1 ou pCOR (hTNFR-Is)2 était évaluée par l'inhibition de la lyse induite par le TNF-α sur les cellules L929. Cette inhibition était évaluée par détermination de la viabilité des cellules L929 grâce à un dosage MTT[367,368].

VI.2.1 *Cellules L929*

Les cellules L929 sont des cellules de tissu conjonctif de souris de morphologie fibroblastique. Elles sont cultivées à 37°C dans une étuve à 5% de CO_2, dans un milieu RPMI 1640 contenant du Glutamax (GibcoBRL), 1% d'antibiotiques (pénicilline 10000 U/mL et streptomycine 10000 µg/mL, Eurobio) et 7% de SVF (GibcoBRL). Ces cellules sont sensibles à la lyse induite par le TNF-α.

VI.2.2 *Evaluation in vitro*

Les cellules L929 (4.10^4 dans 100 µL de milieu) étaient ensemencées dans des plaques de culture 96 puits pendant une nuit.
Une gamme était réalisée en mettant en incubation du TNFR-Is recombinant humain (R&D Systems) à différentes concentrations (0 à 1 000 ng/mL), du TNF-α (200 pg/mL) et de l'actinomycine D (4 µg/mL) dans un volume de 100 µL sur les cellules L929 pendant 18 heures à 37°C.
L'évaluation de l'activité biologique du TNFR-Is contenu dans les surnageants de cellules DBA/Tst transfectées par les différents plasmides (voir IV.2) était réalisée de la façon suivante :

- Un dosage préalable du TNFR-Is dans les surnageants de culture des cellules DBA/Tst transfectées était effectué par ELISA. Cette étape avait pour but de mettre une même quantité de TNFR-Is (2 ng/mL) en contact avec les cellules L929 et donc de pouvoir comparer l'activité biologique du TNFR-Is dans les différents surnageants.
- Ces solutions de surnageants à 2 ng/mL étaient diluées de deux en deux, en présence de 200 pg/mL de TNF-α et de 4 µg/mL d'actinomycine D, dans les puits ensemencés avec les cellules L929. Les échantillons étaient ensuite mis en incubation pendant 18 heures à 37°C avant le dosage au MTT.

VI.2.3 *Evaluation ex vivo*

Cette évaluation était réalisée à l'aide de muscles prélevés deux semaines après électrotransfert de 15 µg de plasmide. Deux muscles pour chaque condition étaient lysés, puis comme précédemment , les lysats étaient dilués de deux en deux, en présence de 200 pg/mL de TNF-α et de 4 µg/mL d'actinomycine D, dans les puits ensemencés avec les cellules L929. Une gamme était aussi effectuée avec du TNFR-Is recombinant humain. Les échantillons étaient mis en incubation pendant 18 heures à 37°C avant le dosage au MTT.

VI.2.4 *Dosage MTT*

Ce dosage repose sur la capacité des mitochondries de cellules viables à réduire le sel de tétrazolium (MTT) en formazan, qui est un sel coloré et insoluble dans l'eau. Le formazan est ensuite solubilisé puis dosé par mesure de l'absorbance à 570 nm. Ce dosage permet ainsi de réaliser des études de cytotoxicité, car le MTT ne détecte que les cellules viables.
Le surnageant de culture de chaque puits était aspiré, puis 80 µL de milieu complet et 20 µL de MTT à 5mg/mL en PBS filtré étaient ajoutés. Une incubation de quatre heures à 37°C permettait la formation des cristaux de formazan, visibles à l'œil. Le surnageant de chaque puits était alors éliminé, puis étaient ajoutés 150 µL de tampon de dissolution (propan-1-ol acidifié par 0,04N d'acide chlorhydrique HCl). Une mesure d'absorbance à 570 nm permettait ensuite de déterminer le pourcentage de cellules viables. Une viabilité de 100% était attribuée aux puits contenant les cellules L929 sans TNF-α.

VI.3. Dosage par ELISA des anticorps anti-hTNFR-Is

Le dosage des anticorps anti-hTNFR-Is était effectué par ELISA. La protéine de capture, fixée au fond de la plaque de dosage par une incubation d'une nuit à température ambiante, était du hTNFR-Is recombinant (R&D Systems) à la concentration de 200 ng/mL. Le blocage était réalisé pendant 2 heures à l'aide de PBS, lait en poudre 4%, et tween20 0,05%. Les échantillons étaient ensuite déposés en dilutions successives, et mis en incubation durant 2 heures. Un anticorps anti Ig de souris (Amersham Biosciences) couplé à la Horse Radish Peroxidase (HRP) au 1/2000 était ensuite mis en incubation deux heures. L'ajout du substrat de la peroxydase, le TMB (tétraméhylbenzidine), permettait l'obtention d'une réaction colorée proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon, qui était stoppée au bout de 10 minutes par ajout d'acide sulfurique H_2SO_4 2N.
Une gamme étalon était réalisée à l'aide de dilutions successives de l'anticorps de capture du kit ELISA hTNFR-Is (Duoset R&D Systems), entre 500 ng/mL et 0,3 ng/mL.
La concentration en protéine de chaque échantillon pouvait être déterminée, en µg/mL, par mesure de l'absorbance à 450 nm et grâce à la gamme étalon réalisée. Cependant, pour les anticorps, la notation utilisée est le titre en anticorps. Un sérum est considéré immunoréactif si l'absorbance obtenue après le traitement est supérieure ou égale à deux fois l'absorbance obtenue avant traitement. Le titre en anticorps est alors égal à l'inverse de la dilution du sérum qui donne une absorbance égale à deux fois celle obtenue avec du sérum de souris naïves. Dans les expériences réalisées, nous ne souhaitions pas déterminer avec précision le titre en anticorps ; les échantillons présentant des taux élevés d'anticorps sont ceux possédant un titre en anticorps supérieur ou très supérieur à 200, les dilutions ultérieures n'ayant pas été réalisées.

VI.4. Dosage de l'activité luciférase

Le dosage était effectué sur des échantillons de muscle ciliaire. Les échantillons étaient lysés dans 300 µL de tampon de lyse (Luciferase cell culture lysis, Promega) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (Protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics) à l'aide d'un ultra-turrax. Les tubes étaient ensuite centrifugés à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C.
Le dosage était effectué à l'aide d'un test bioluminescent commercial : Luciferase Assay System (Promega). Le principe du test repose sur le fait que la luciférase catalyse l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine, réaction qui s'accompagne d'une émission de lumière proportionnelle à la quantité de protéine présente. La mesure de la luminescence s'effectuait sur 10 µL de surnageant de broyat de muscle ciliaire, une seconde après ajout de 50 µL de Luciferase Assay Substrate, dans une plaque blanche 96 puits. La mesure était effectuée sur 10 secondes à l'aide d'un luminomètre à plaque Victor (1420 Multilabel counter, Wallac, USA). Les résultats étaient exprimés pour l'échantillon entier en coups par seconde (cps).

VI.5. Dosage par ELISA des anticorps anti-luciférase

Le dosage des anticorps anti-luciférase était effectué par ELISA. La protéine de capture, fixée au fond de la plaque de dosage par une incubation d'une nuit à température ambiante, était de la luciférase recombinante (Sigma) à la concentration de 1 µg/mL. Le blocage était réalisé pendant 1 heure à l'aide de PBS, gélatine 0,2% et tween20 0,05%. Les échantillons étaient ensuite déposés en dilutions successives, et mis en incubation une heure. Un anticorps anti Ig de souris (Amersham Biosciences) couplé à la Horse Radish Peroxidase (HRP) au 1/2000 était ensuite mis en incubation une heure. L'ajout du substrat de la péroxidase, le TMB (tétraméhylbenzidine), permettait une réaction colorée proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon, qui était stoppée au bout de 10 minutes par ajout de H_2SO_4 2N.
Une gamme étalon était réalisée à l'aide de dilutions successives d'un anticorps IgG1 anti-luc (Sigma), entre 1 µg/mL et 40 ng/mL.
La concentration de protéine de chaque échantillon peut être déterminée, en µg/mL, par mesure de l'absorbance à 450 nm et grâce à la gamme étalon réalisée. Cependant, comme pour le dosage des anticorps anti-hTNFR-Is, nous avons utilisé une expression en titre d'anticorps, selon les mêmes critères et avec les mêmes limites, un échantillon présentant un taux élevé d'anticorps correspondant à un titre supérieur ou très supérieur à 200.

VI.6. Détermination de l'activité myéloperoxidase (MPO) pulmonaire

La présence des neutrophiles dans le tissu pulmonaire était quantifiée par le dosage de l'activité myéloperoxydase (MPO). Ce dosage repose sur la transformation du peroxyde d'hydrogène par la MPO en un composé qui peut réagir avec un chromophore, l'ortho-dianisidine.
Après sacrifice de la souris, le thorax était ouvert, le poumon était prélevé et déposé sur de la gaze afin d'éliminer le sang présent. Chaque poumon était ensuite congelé à –20°C à sec jusqu'au jour du dosage. L'activité myéloperoxidase (MPO) du tissu pulmonaire était déterminée selon la méthode décrite par Hirano *et al*[369] et modifiée comme suit. Les poumons étaient homogénéisés dans 1 mL de PBS, pendant 30 secondes à 4°C, à l'aide d'un potter. L'homogénat était alors centrifugé (10000 g, 10 min, 4°C) et le surnageant, contenant l'hémoglobine, était éliminé. Le culot était ensuite repris dans 1 mL de PBS supplémenté en bromure d'hexadécyl-triméthyl-ammonium (HTBA 0,5 %) et en acide éthylènediamine-tétra-acétique (EDTA 5mM) puis homogénéisé à nouveau. Après une nouvelle centrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C), 50 µL de surnageant étaient déposés dans un tube contenant 200 µL de PBS-HTBA-EDTA, 2 mL de HBSS (Hank's balanced salt solution, le tampon de la réaction), 100 µL de O-dianisidine dihydrochloride (1,25 mg/mL, substrat colorable), et 100 µL de H_2O_2 (0,4 mM, agent peroxydant). Après 30 min d'incubation à 37°C avec agitation, la réaction de coloration était stoppée par addition de 100 µL d'azoture de sodium (NaN_3 1%). L'activité MPO était déterminée par lecture de l'absorbance à 460 nm.

VII. Imagerie optique du petit animal

VII.1. Dispositif et réalisation des acquisitions

Les études en imagerie optique étaient réalisées à l'aide d'une caméra CCD refroidie (température de travail : -25°C) de marque Apogee (Ap47p) équipée d'un objectif macro (focale : 60mm). La caméra était fixée à un support permettant de régler sa hauteur (fixée à 40 cm). L'ensemble était placé dans un caisson afin d'éviter les lumières parasites lors des mesures de luminescence.

Pour les mesures de luminescence, l'objectif de la caméra était ouvert au diaphragme F 2,8. Aucune lumière d'excitation ni de filtre d'émission n'était requis. L'acquisition des données se faisait sur 120 à 180 secondes, et était toujours réalisée au même temps après injection locale (50µg/10µL en intra-articulaire) ou intrapéritonéale (2,5mg/250µL) du substrat luciférine.

VII.2. Analyse des données

La caméra était connectée à un ordinateur. L'acquisition des images était pilotée par le logiciel MaxImDL. Les traitements et analyses des images étaient réalisés à l'aide de BêtaVision+ fournit par la société Biospace. La quantification de la luminescence détectée était réalisée sur des zones d'intérêt dessinées à la main après avoir défini une échelle de luminescence (en fausse couleur), conservée pour toute l'expérience. La valeur de la luminescence ainsi déterminée correspondait à la somme des signaux obtenus dans cette zone d'intérêt durant une minute, et était exprimée en coups par minute (cpm).

VIII. Modèle d'inflammation aiguë induite par le LPS

Afin de tester, sur un modèle animal d'inflammation, l'effet pouvant être obtenu après électrotransfert des plasmides codant les variants du hTNFR-Is, nous avons choisi d'étudier un modèle d'inflammation aiguë provoquée au LPS.

VIII.1. Procédure expérimentale générale

Les souris SWISS étaient électrotransférées i.m avec les plasmides pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2 ou NaCl 150 mM. Les souris traitées, ainsi les souris témoins, étaient exposées au LPS deux semaines plus tard. Un groupe de souris était laissé naïf. Les souris étaient sacrifiées deux heures plus tard. Les quantités de cytokines circulantes TNF-α et IL-1β ainsi que la MPO pulmonaire étaient évaluées.

VIII.2. Prétraitement par électrotransfert i.m

Les souris étaient traitées par électrotransfert intramusculaire de 25 µg dans 30 µL de plasmide pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2, dans chacun des muscles tibiaux craniaux. Les souris contrôles étaient traitées par injection et électrotransfert de 30 µL de NaCl 150 mM.

VIII.3. Induction de l'inflammation aiguë

L'inflammation était provoquée par injection intrapéritonéale de 330 µg/kg souris de LPS. Le modèle utilisé correspond donc à une inflammation aiguë systémique, et en particulier pulmonaire. L'inflammation est provoquée avec une dose très inférieure à celles utilisées dans les modèles de choc septique létaux induits au LPS (entre 30 et 50 mg/kg).

Deux heures après l'injection de LPS, les souris étaient sacrifiées ; le sang, les muscles et les poumons étaient prélevés.

IX. Modèle de traumatisme crânien

IX.1. Procédure expérimentale générale

L'expérience était réalisée sur des souris mâles SWISS âgées de 6 semaines, de masse comprise entre 21 et 25 grammes. La souris était maintenue fermement en contention par le dos. Elle était anesthésiée brièvement en présence d'air et d'oxygène additionné de 2% d'halotane. La tête était introduite sous le dispositif de percussion sur un moulage en résine. La tige de percussion était placée en position médiane sur la boîte crânienne de la souris entre les oreilles et les yeux. Une masse de 50 grammes était lâchée le long de la tige de percussion d'une hauteur définie à partir d'un lot de souris test pour chaque expérience (entre 26 et 30 cm). Immédiatement après l'impact, les souris présentaient une perte de redressement ainsi que des convulsions. Une mortalité de 30% était observée dans les 10 premières minutes suivant l'impact. Les animaux étaient ensuite remis dans leur cage avec un libre accès à l'eau et à la nourriture.

IX.2. Evaluation du déficit neurologique

Le déficit neurologique était évalué après le traumatisme crânien par des tests d'agrippement. Ce test était pratiqué à l'aide d'une tige d'acier horizontale de 3 millimètres de diamètre, maintenue à 40 centimètres au dessus du plan de travail. La souris maintenue par l'extrémité de la queue était placée de manière à ce que les pattes antérieures soient au contact de la tige. Sur une durée maximale de 30 secondes, on mesurait la durée pendant laquelle la souris restait accrochée ("grip test"). On évaluait également les performances d'agrippement de la souris sur la tige à l'aide du "string test" comme décrit ci-dessous.

Score	Echelle
0	Chute au cours de la période des 30s
1	Reste accrochée durant 30s
2	Reste accrochée durant 30s et s'accroche par les 4 pattes pendant au moins 5s
3	Reste accrochée durant 30s et s'accroche par les 4 pattes et par la queue pendant au moins 5s
4	Reste accrochée durant 30s et s'accroche par les 4 pattes et par la queue et se promène sur la tige pendant au moins 5s
5	Atteint une des barres verticales au cours de la période des 30s

IX.3. Evaluation de l'œdème cérébral : mesure du contenu en eau

L'œdème cérébral était évalué par mesure de la teneur en eau, obtenue par la différence entre la masse humide et la masse sèche. Les souris étaient anesthésiées par le mélange xylazine-kétamine puis décapitées, et les cerveaux étaient disséqués et placés sur une plaque réfrigérée. Une carotte de tissu de 4 mm de diamètre était prélevée au niveau de la zone de la lésion et de la zone controlatérale à l'aide d'un emporte-pièce. La carotte était immédiatement pesée dans une coupelle en aluminium tarée au préalable. Cette pesée correspondait à la masse humide. L'échantillon était ensuite mis à sécher dans une étuve maintenue à 100°C durant 24 heures, puis de nouveau pesé, ce qui donnait la masse sèche.

Le pourcentage en eau était calculé de la manière suivante :

%eau = (masse humide – masse sèche)*100/masse humide

X. Uvéite expérimentale aux endotoxines

X.1. Procédure générale

Le modèle d'uvéite utilisé était l'uvéite induite par les endotoxines (UIE), modèle d'inflammation intra-oculaire aiguë. L'inflammation observée est maximale 24 heures après injection de LPS, et est résolue en 96 heures.
Sachant que l'électrotransfert n'induit pas une production immédiate de protéine, mais que ce maximum est généralement atteint une semaine après électrotransfert (dans le muscle), le traitement par électrotransfert dans ce modèle était effectué six jours avant injection du LPS.

X.2. Prétraitement par électrotransfert

Les rats étaient traités par injection seule, ou suivie d'un électrotransfert, de 3µg ou 30 µg de plasmide en solution dans 10 µl de NaCl 150mM (pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 ou plasmide contrôle pVAX2), ou de NaCl 150mM dans le muscle ciliaire. Le même traitement était réalisé dans les deux yeux du même animal.

X.3. Induction de la maladie

Six jours après électrotransfert, la maladie était induite par injection de 150µg de LPS de *Salmonella typhimurium* (Sigma) dans la voûte plantaire de la patte droite des rats.

X.4. Evaluation de l'uvéite

X.4.1 *Signes cliniques*

Les scores cliniques de l'uvéite étaient évalués 24 heures après l'induction au LPS, les rats étaient ensuite sacrifiés.
Les scores étaient attribués selon une échelle de mesure[370] : 0=normal, 1=légère vasodilatation de l'iris et des vaisseaux conjonctifs, 2=vasodilatation modérée de l'iris et des vaisseaux conjonctifs, 3=forte vasodilatation des vaisseaux de l'iris et des vaisseaux conjonctifs avec moins de 10 cellules dans la chambre antérieure dans le champ de la lampe à fente, 4=identique à 3 avec de nombreuses cellules dans la chambre antérieure formant un hypopion et/ou des dépôts de fibrine, 5=réaction inflammatoire intense dans la chambre antérieure avec isolement total de la pupille.

X.4.2 *Signes histologiques*

Les yeux étaient prélevés 24 heures après induction au LPS puis fixés 1 heure dans du paraformaldéhyde 4% (PFA), rincés au PBS et inclus dans de la gomme adragante. L'ensemble du globe oculaire était coupé au microtome à congélation. Les sections passant par le nerf optique étaient colorés à l'hématoxyline-éosine et les cellules infiltrées (polynucléaires et macrophages) étaient comptées "en aveugle" dans les segments antérieur et postérieur de l'œil[370]. Pour chaque animal, le nombre de cellules représentait la moyenne de trois sections.

XI. Arthrite expérimentale au collagène

XI.1. Induction de la maladie

Le collagène bovin de type II (CII, Morwell Diagnostics) était préalablement solubilisé à une concentration de 2 mg/mL dans une solution d'acide acétique à 0,3% et conservé à –20°C. Les souris DBA/1 mâles étaient immunisées par voie sous-cutanée à la base de la queue avec 50 µg de CII bovin émulsionnés dans 25 µL d'adjuvant complet de Freund (ACF, GibcoBRL). Un rappel était effectué 21 jours plus tard par injection de 50 µg de CII bovin émulsionnés dans 25 µL d'adjuvant incomplet de Freund (AIF, BioValley).

XI.2. Evaluation des arthrites

XI.2.1 *Signes articulaires cliniques*

Les articulations étaient observées dès le 25ème jour après l'immunisation afin de suivre l'apparition de signes articulaires cliniques. Pour chaque groupe d'articulations (orteil, tarse et cheville pour la patte postérieure, carpe et doigts pour la patte antérieure), des scores étaient établis à l'aide d'une échelle de mesure : 0=normal, 1=érythème, 2=gonflement, 3=déformation, 4=nécrose. Les scores de chaque souris correspondaient à la somme des scores de chaque groupe articulaire. Les résultats étaient exprimés à l'aide de la moyenne des scores des animaux de chaque groupe et la SEM correspondante à un jour donné.

XI.2.2 *Atteintes histologiques au sacrifice*

Lors du sacrifice, les pattes postérieures des souris étaient prélevées pour l'examen histologique. Les pattes étaient fixées dans du formol pendant 24 heures. Après décalcification dans du Rapid Decalcifiant Osseux (Eurobio) pendant 5 heures, une déshydratation était réalisée par trois bains successifs dans l'éthanol à 75°, puis à 95° et enfin 100%. Les pattes pouvaient ensuite être conservées dans le 2-méthyl propan-1-ol avant d'être incluses en paraffine. Des sections de tissus (6 µm) étaient déparaffinées dans le xylène puis réhydratées dans des bains d'éthanol. Elles étaient ensuite colorées avec l'hémalun et l'éosine. Les atteintes histologiques pouvaient alors être évaluées selon une échelle à 4 points allant de 0 à 3 : 0=normal, 3=sévère[371].

XII. Localisation sur coupes histologiques des cellules transfectées par électrotransfert intra-oculaire

Afin de localiser les cellules transfectées suite à injection et électrotransfert du plasmide codant la protéine fluorescente GFP dans le muscle ciliaire, nous avons réalisé des coupes histologiques, suivies d'analyses histochimiques et immunohistochimiques.
Les yeux traités étaient prélevés et fixés pendant une heure dans une solution de PFA (4%, paraformaldéhyde), rincés au PBS, inclus dans de la gomme adragante, puis des cryosections de 8µm étaient réalisées. Afin de visualiser les noyaux cellulaires, une coloration au DAPI (Sigma, 1/3000, 4',6-diamino-2-phénylindole) était réalisée, suivie d'un lavage au PBS et d'un montage des coupes histologiques sur lames à l'aide d'un mélange glycérol/PBS (1/1). Les coupes étaient analysées en microscopie à fluorescence et des photographies numériques étaient prises avec un temps d'exposition constant.
Une coloration immunohistochimique permettant de localiser le muscle ciliaire était effectuée à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti α-actine de muscle lisse humain (anti-α-sm-1, Chemicon). Les coupes de tissu étaient fixées cinq minutes dans l'acétone à -20°C puis séchées à l'air.

L'anticorps secondaire était un anticorps de singe anti-IgG de souris conjugué au marqueur fluorescent Texas Red (1/50, Jackson Immunoresearch). Les noyaux cellulaires étaient colorés au DAPI (1/3000, Sigma). Les lames histologiques étaient ensuite rincées au PBS puis montées dans un mélange glycérol/PBS (1/1). Un contrôle négatif était réalisé en utilisant du sérum de rats pré-immunisés à la place de l'anticorps primaire.

XIII. Statistiques

L'analyse statistique des résultats était réalisée à l'aide d'un logiciel de statistiques (Statview). Les résultats étaient exprimés en moyenne ± écart standard à la moyenne (SEM). Pour les variables discontinues, l'analyse statistique était effectuée à l'aide d'un test U de Mann-Withney. Concernant les mesures répétées, l'analyse statistique était effectuée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA).

RESULTATS

I. Construction et validation des variants du hTNFR-Is

I.1. Clonage et validation *in vitro*

I.1.1 *Clonage et expression de hTNFR-Is*

Nous avons construit trois plasmides codant une forme monomérique (hTNFR-Is), chimérique (hTNFR-Is/mIgG1) ou dimérique ((hTNFR-Is)2) du récepteur soluble de type I du TNF-α humain. Ces transgènes ont tout d'abord été produits par des plasmides de squelette pCOR. Ces mêmes transgènes ont ensuite été reclonés dans un vecteur d'expression pVAX2, et les taux d'expression obtenus ont été contrôlés et comparés à ceux des plasmides pCOR. Les taux local (muscle électrotransféré) et systémique (sérum) obtenus étaient équivalents pour les deux types de plasmides. Dans la suite, il sera précisé si les études ont été effectuées à l'aide de plasmides de squelette pCOR, ou de squelette pVAX2.

Afin de contrôler l'expression de hTNFR-Is par les plasmides obtenus, une transfection transitoire des cellules DBA/Tst a été effectuée à l'aide des plasmides pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2, et en contrôle pCOR Vide. La production de hTNFR-Is obtenue dans le surnageant de culture 48 heures après transfection a été quantifiée par ELISA. La production de protéine était ensuite ramenée à une production de hTNFR-Is par million de cellules et par 24 heures.
Nous avons ainsi obtenu 165,5 ± 5,8 ng/24h/million de cellules avec pCOR hTNFR-Is, 114,2 ± 8,0 ng/24h/million de cellules avec pCOR hTNFR-Is/mIgG1, et 23,2 ± 0,8 ng/24h/million de cellules avec pCOR (hTNFR-Is)2. La transfection de plasmide contrôle pCOR Vide conduisait à une détection nulle de hTNFR-Is.

I.1.2 *Activité biologique des variants du hTNFR-Is*

Nous avons étudié l'activité biologique du hTNFR-Is (capacité de liaison au TNF-α) contenu dans les surnageants des cellules DBA/Tst transfectées par les plasmides pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1 ou pCOR (hTNFR-Is)2 par test d'inhibition de la lyse des cellules L929 par le TNF-α.

Une solution de TNFR-Is était préparée à partir de chaque surnageant de culture de cellules DBA/Tst transfectées par les différents plasmides (pour obtenir une concentration finale identique de 2 ng/mL de hTNFR-Is) puis était mise en contact avec les cellules L929 en présence de TNF-α (200 pg/mL) et d'actinomycine D (4 µg/mL) pendant 18 heures, avant dosage colorimétrique au MTT. Les contrôles positif et négatif d'inhibition de la lyse induite par le TNF-α correspondaient à des surnageants de culture de cellules DBA/Tst non transfectées, mis en incubation pendant 18 heures avec les cellules L929, en absence de TNF-α ou en présence de TNF-α à 200 pg/mL.

Le tableau suivant montre les pourcentages de survie cellulaire en présence des différents surnageants de cellules, transfectées ou non, qui correspondent à une inhibition de la lyse induite par le TNF-α sur les cellules L929.

[TNF-α]=200 pg/mL	Surnageant de cellules transfectées par	Survie cellulaire (% des cellules contrôles)
+	pCOR hTNFR-Is	6
+	pCOR hTNFR-Is/mIgG1	65
+	pCOR (hTNFR-Is)2	71
+	Cellules non transfectées	0
-	Cellules non transfectées	100

Tableau 5 : Survie des cellules L929 mises en incubation en présence des TNFR-Is contenus dans les surnageants de cellules DBA/Tst transfectées. Un surnageant de cellules DBA/Tst non transfectées constituait le contrôle positif. Les cellules L929 étaient mises en présence de 200 pg/mL de TNF-α, 4 µg/mL d'actinomycine D et des différents surnageants pendant une nuit. La détermination de la viabilité des cellules L929 était effectuée par un dosage au MTT. Une viabilité de 100% était attribuée aux cellules L929 en absence de TNF-α et en présence de surnageant de cellules DBA/Tst non transfectées. Une viabilité de 0% était attribuée aux cellules L929 en présence de TNF-α et de surnageant de cellules DBA/Tst non transfectées.

Ces résultats montrent que les plasmides pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1 et pCOR (hTNFR-Is)2 sont fonctionnels car ils permettent la production d'une protéine hTNFR-Is capable de lier le TNF-α et d'inhiber son action cytotoxique sur les cellules L929. Cependant les trois formes de protéine hTNFR-Is n'ont pas la même efficacité. Ainsi, la forme dimérique et la protéine de fusion inhibent de manière comparable l'activité biologique du TNF-α *in vitro*. La forme monomérique, en revanche, exerce une activité inhibitrice 11,5 à 12,5 fois plus faible, comparée à la forme dimérique et à la protéine de fusion, respectivement.

I.2. Activité biologique des récepteurs solubles après électrotransfert intramusculaire

I.2.1 *Test d'activité sur cellules L929*

L'activité biologique des variants du récepteur soluble du hTNFR-Is produits *in vivo* suite à électrotransfert intramusculaire a été évaluée par la capacité des lysats musculaires à inhiber la cytotoxicité du TNF-α sur les cellules L929, dans les même conditions que la validation *in vitro* des plasmides.

Les prélèvements étaient effectués 15 jours après électrotransfert de 15 µg des plasmides pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2, et pCOR Vide comme contrôle. Des lysats musculaires de souris naïves étaient aussi utilisés comme contrôle.

Lysats de muscles transfectés par	hTNFR-Is (ng/mL)	Survie cellulaire (% des cellules contrôles)
/	non détectable	14 ± 0
pCOR Vide	non détectable	14 ± 1
pCOR hTNFR-Is	96	73 ± 2
pCOR hTNFR-Is/mIgG1	45	84 ± 12
pCOR (hTNFR-Is)2	4	52 ± 15
Milieu de culture avec [TNF-α]=200 pg/mL		0
Milieu de culture sans TNF-α		100

Tableau 6 : Survie des cellules L929 mises en incubation en présence des TNFR-Is contenus dans les lysats musculaires de souris électrotransférées 14 jours auparavant avec 15µg de plasmide. Le test a été réalisé dans les mêmes conditions que pour l'expérience in vitro. (moyenne ± SEM, n=2).

Les lysats musculaires de souris naïves ou électrotransférées par le plasmide pCOR Vide permettaient la survie de 14% des cellules L929. Par contre, les lysats musculaires des souris électrotransférées par les trois plasmides codant les variants du hTNFR-Is conduisaient à une forte inhibition de la cytotoxicité du TNF-α car un fort pourcentage des cellules reste en vie. Ceci démontre la bioactivité des trois variants produits par le muscle de souris. Comparé aux résultats obtenus *in vitro*, nous avons obtenu une activité biologique de la forme monomérique qui semble plus élevée, mais ceci s'explique par le fait que le test est réalisé avec environ 50 fois plus de monomère, produit par le muscle, qu'il n'y avait de monomère dans le surnageant des cellules DBA/Tst.
Cette quantification n'a pas pu être effectuée sur le sérum des souris électrotransférées, à cause d'un effet d'inhibition global du sérum.

I.2.2 *Validation de l'activité biologique des hTNFR-Is sur un modèle in vivo d'inflammation au LPS*

Afin d'évaluer plus précisément l'efficacité biologique des hTNFR-Is produits suite à électrotransfert intramusculaire des plasmides pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2, un modèle d'inflammation aiguë a été utilisé, par injection intrapéritonéale de LPS (lypopolysaccharide, endotoxine de *Escherischia coli*). Un groupe contrôle était réalisé par injection et électrotransfert de NaCl suivi d'une induction de l'inflammation au LPS, et un groupe contrôle était laissé naïf.
La dose de LPS utilisée dans cette expérience est très inférieure à celles utilisées pour induire un choc septique létal (30-50 mg/kg).
Avec la dose de LPS employée, il est possible de provoquer chez la souris une inflammation pulmonaire. Le LPS est en effet un agent inflammatoire qui induit chez la souris SWISS le recrutement de neutrophiles et la production de TNF-α dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, ainsi qu'une séquestration des neutrophiles dans les poumons, évaluée par l'activité myéloperoxydase (MPO). Il a été montré que le taux de TNF-α ainsi produit atteignait un maximum sérique 90 minutes après l'administration de LPS[372]. Dans cette même étude, le prétraitement des animaux par un anticorps anti-TNF inhibait totalement le taux circulant de TNF-α, mais était sans effet sur la MPO pulmonaire.

Dans cette étude, nous avons donc souhaité évaluer les effets des variants transgéniques du hTNFR-Is vis-à-vis de l'inflammation induite par le LPS. Les protéines étaient produites par le muscle tibial

cranial de souris SWISS, électrotransférées avec 2*25 µg de plasmide deux semaines avant induction de l'inflammation. Nous avons évalué les taux de TNF-α et d'IL-1β circulants, les deux cytokines étant très liées, et la MPO pulmonaire.

I.2.2-a) Effet sur le TNF-α circulant

La stimulation au LPS induisait une production de TNF-α systémique d'environ 1,8 ng/mL, qui était nettement inhibée dans les groupes traités par électrotransfert de l'un des trois plasmides anti-TNF. L'inhibition de TNF-α systémique était la plus significative pour les formes dimérique et chimérique du hTNFR-Is. Les résultats obtenus sont bien en accord avec ceux rapportés dans la littérature, et mettent en évidence la bioactivité des variants du hTNFR-Is produits par électrotransfert intramusculaire.

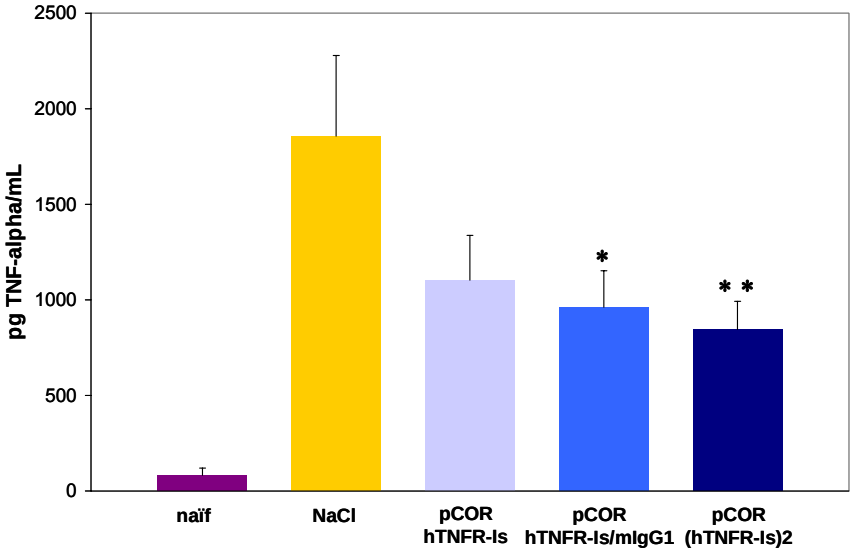


*Figure 16 : Concentration de TNF-α circulant, deux heures après stimulation au LPS (330µg/kg en i.p). Les souris étaient électrotransférées 14 jours auparavant avec 2*25 µg de plasmide pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2 ou NaCl (contrôle). Un autre groupe était laissé naïf. (moyenne + SEM, n=6).* ***** *: p<0,05,* ****** *: p<0,025 versus NaCl (Mann-Whitney).*

I.2.2-b) Effet sur l'IL-1β circulante

Nous avons voulu vérifier si l'électrotransfert des variants du hTNFR-Is avait un effet sur d'autres médiateurs crucialement impliqués dans ce modèle d'inflammation au LPS ; nous nous sommes intéressé à la production systémique d'IL-1β. L'injection de LPS induisait en effet une forte production d'IL-1β systémique d'environ 2,1 ng/mL. Cette cytokine était inhibée dans les groupes traités par électrotransfert de l'un des trois plasmides anti-TNF. Cette diminution était modérée par le traitement par la forme dimérique du hTNFR-Is, mais elle était significative pour les formes monomérique et chimérique du hTNFR-Is.

La forme dimérique, qui inhibait efficacement le taux de TNF-α circulant, conduisait à un effet plus modéré sur le taux d'IL-1β détecté. Or les variants du hTNFR-Is ont un mode d'action identique : ils agissent par liaison directe avec le TNF-α et inhibent son activité biologique. Nous pouvions donc nous attendre à ce qu'une inhibition du taux de TNF-α par le dimère identique à celle obtenue par les deux autres formes entraîne aussi des effets similaires sur d'autres médiateurs de l'inflammation, comme l'IL-1β.

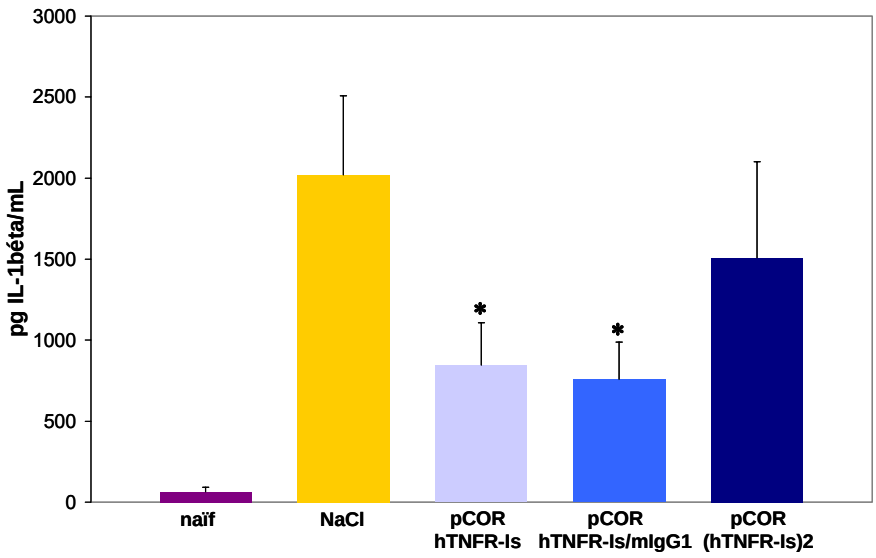


*Figure 17 : Concentration d'IL-1β circulante, deux heures après stimulation au LPS (330µg/kg en i.p). Les souris étaient électrotransférées 14 jours auparavant avec 2*25 µg de plasmide pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2 ou NaCl (contrôle). Un autre groupe était laissé naïf. (moyenne + SEM, n=6). * : p<0,05 versus NaCl (Mann-Whitney).*

I.2.2-c) Effet sur la MPO pulmonaire

Le modèle d'inflammation utilisé induit un fort recrutement de neutrophiles, mis en évidence par dosage de la MPO. Le TNF-α est un puissant activateur du recrutement cellulaire en cas d'inflammation. Nous avons donc souhaité évaluer les effets potentiels des différents traitements par hTNFR-Is sur le recrutement cellulaire.

Le traitement par les variants du hTNFR-Is avait un effet inhibiteur sur la séquestration des neutrophiles dans les poumons, lorsque les formes dimérique et chimérique sont utilisées, la forme monomérique ne permettant pas de réduire la MPO. Ces résultats ne représentaient qu'une tendance et n'étaient pas statistiquement significatifs.

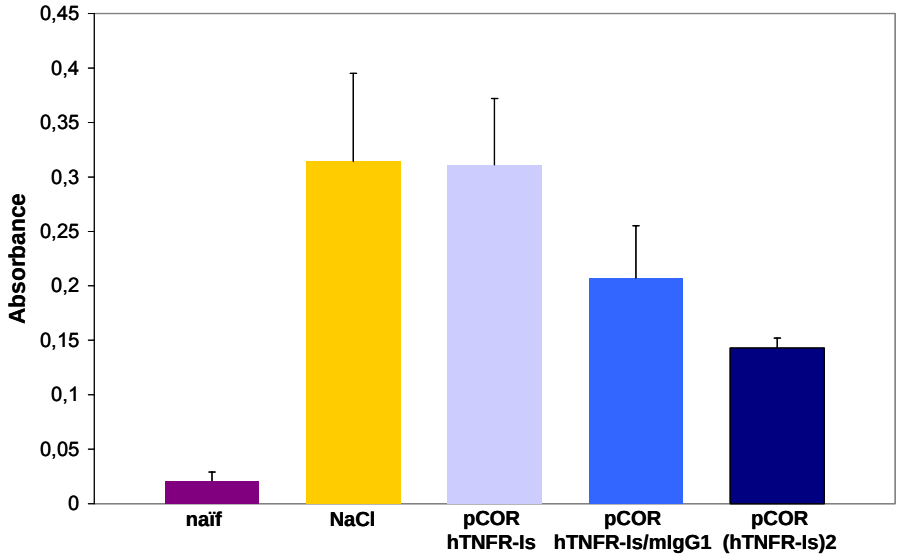


*Figure 18 : Evaluation de la myéloperoxydase du tissu pulmonaire (MPO), deux heures après stimulation au LPS (330µg/kg en i.p). Les souris étaient électrotransférées 14 jours auparavant avec 2*25 µg de plasmide pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2 ou NaCl (contrôle). Un autre groupe était laissé naïf. (moyenne + SEM, n=6).*

Les résultats obtenus (tendance ou résultats statistiquement significatifs) dans ce modèle d'inflammation aiguë systémique induit par le LPS permettent de confirmer l'activité biologique *in vivo* des variants du hTNFR-Is produits par le muscle électrotransféré. Dans ce modèle, l'activité des hTNFR-Is était directe, par inhibition du taux systémique de TNF-α, mais permettait aussi d'obtenir des effets sur d'autres facteurs de l'inflammation comme la cytokine IL-1β et le recrutement leucocytaire. Nous n'avons pas poursuivi plus avant cette étude, qui nous servait uniquement de modèle de validation. L'utilisation de ces protéines transgéniques semble donc pertinente comme traitement anti-inflammatoire.

II. Validation des méthodes d'électrotransfert et caractéristiques d'expression obtenues

II.1. Electrotransfert intramusculaire

L'électrotransfert intramusculaire d'ADN est désormais une méthode classique de transfert de gène. Des conditions électriques standards ont été définies, qui permettent un niveau de transfection 100 à 10 000 fois supérieur à celui obtenu par une simple injection d'ADN[142,309,365]. Nous avons donc utilisé ces conditions pour étudier les caractéristiques d'expression des variants de hTNFR-Is.

II.1.1 *Effet dose*

Nous avons étudié la production *in vivo* de TNFR-Is après électrotransfert dans le muscle tibial cranial gauche de différentes quantités de plasmides pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2, ou NaCl (témoin). Dans ce but, les plasmides (1 µg, 3 µg, 5 µg ou 15 µg) ont été électrotransférés chez les souris DBA/1, et la production de TNFR-Is a été évaluée par ELISA dans les lysats du muscle électrotransféré, du muscle de la patte controlatérale (non injectée), et dans le sérum, 10 jours après électrotransfert. Les résultats obtenus pour les muscles ont été normalisés par la concentration de protéines totales produites dans le muscle.

II.1.1-a) Expression dans le muscle

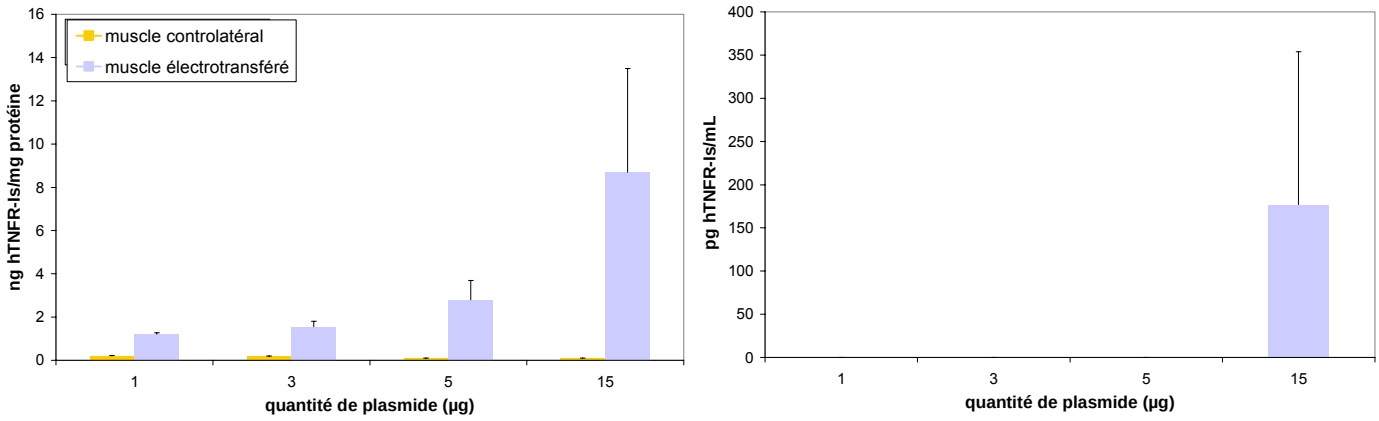
La figure 19 (partie gauche) montre que les taux d'expression des transgènes dans le muscle électrotransféré étaient dépendant des doses de plasmide électrotransféré, et ce pour tous les plasmides étudiés ; cet effet dose permettait d'obtenir une relation presque linéaire dans le cas du pCOR hTNFR-Is/mIgG1.
La production de protéine dans le muscle ainsi déterminée était du même ordre de grandeur pour les plasmides codant le TNFR-Is : environ 10,00 ng de hTNFR-Is/mg de protéine pour 15 µg de plasmide injecté.
La production de hTNFR-Is était détectable dès 1 µg de plasmide électrotransféré : 1,21 ng de hTNFR-Is/mg de protéine pour le pCOR hTNFR-Is, 1,00 ng de hTNFR-Is/mg de protéine pour le pCOR hTNFR-Is/mIgG1, et 0,16 ng de hTNFR-Is/mg de protéine pour le pCOR (hTNFR-Is)2, en moyenne.
La production de TNFR-Is dans le muscle controlatéral était, dans tous les cas, presque nulle.

II.1.1-b) Expression dans le sérum

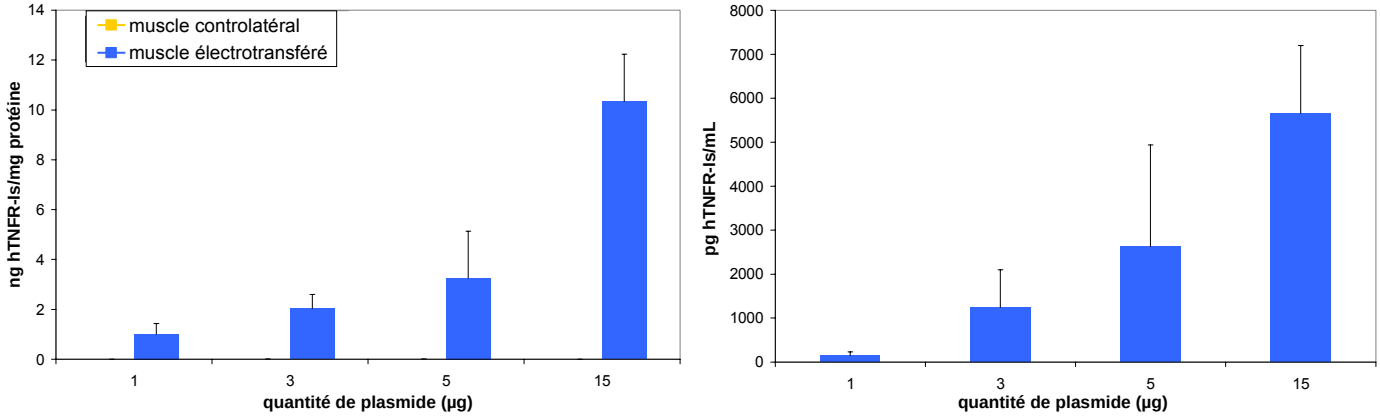
L'expression obtenue par dosage ELISA dans le sérum variait également en fonction de la quantité de plasmide injectée (Figure 19, partie droite). Le TNFR-Is produit par le plasmide pCOR hTNFR-Is n'était détecté qu'après électrotransfert de 15 µg de plasmide. En revanche, le TNFR-Is produit après électrotransfert de pCOR hTNFR-Is/mIgG1 et de pCOR (hTNFR-Is)2 était détectable dès la dose de 1 µg de plasmide injecté. Le taux de protéine de fusion hTNFR-Is/mIgG1 était nettement supérieur aux autres taux de TNFR-Is produits après électrotransfert de pCOR hTNFR-Is ou de pCOR (hTNFR-Is)2 ; cet effet dose permettait d'obtenir une relation presque linéaire dans le cas du pCOR hTNFR-Is/mIgG1.

Expression locale **Expression systémique**

pCOR hTNFR-Is



pCOR hTNFR-Is/mIgG1



pCOR (hTNFR-Is)2

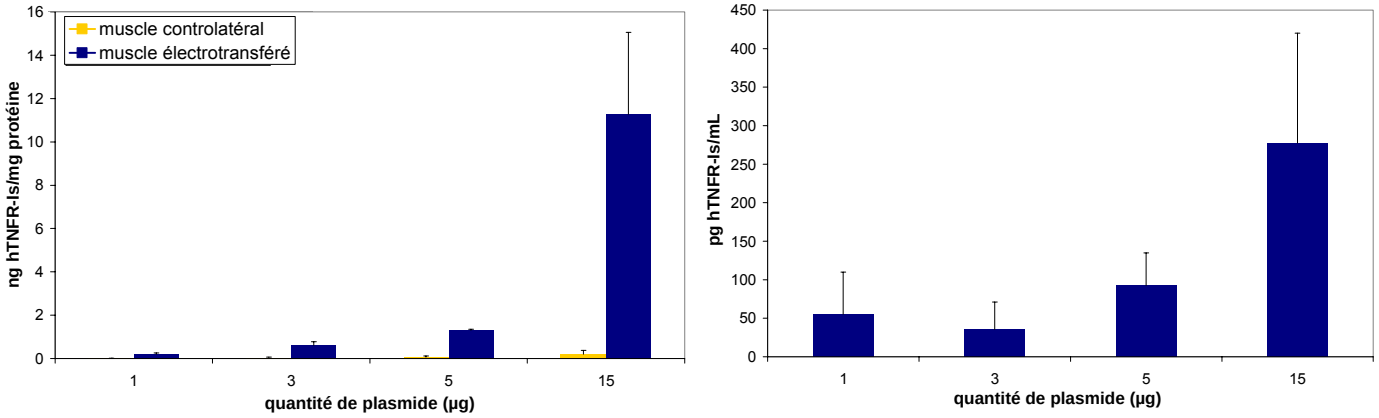


Figure 19 : Expression dose-dépendante des variants de hTNFR-Is dans le muscle et dans le sérum après électrotransfert i.m. Les concentrations de hTNFR-Is ont été déterminées par ELISA 10 jours après électrotransfert de doses croissantes (1, 3, 5, 15 µg) de plasmide pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2. Dans les muscles ou le sérum de souris électrotransférées avec le plasmide contrôle pCOR Vide, des valeurs non significatives de hTNFR-Is ont été détectées. (moyenne + SEM, n=2).

II.1.2 ***Etude cinétique***

Afin de suivre la cinétique d'expression de TNFR-Is, 15 µg de plasmide pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2, ou pCOR Vide (témoin) ont été électrotransférés dans le muscle tibial cranial gauche de souris DBA/1. La production de TNFR-Is était évaluée par ELISA dans le muscle électrotransféré, le muscle de la patte controlatérale (non injectée), et dans le sérum, 3 jours, 7 jours, 14 jours, 1 mois, puis tous les mois jusqu'à 6 mois après électrotransfert. Les résultats obtenus pour les muscles étaient normalisés par la concentration de protéines totales produites dans le muscle.

II.1.2-a) Expression dans le muscle

Les résultats obtenus (Figure 20, partie gauche) mettaient en évidence une expression des TNFR-Is pendant au moins 6 mois après électrotransfert. Les taux maximaux étaient atteints entre sept et quatorze jours après électrotransfert pour les pCOR hTNFR-Is et pCOR (hTNFR-Is)2, (11,66 et 11,28 ng de hTNFR-Is/mg de protéine, respectivement). Pour la protéine hTNFR-Is/mIgG1, la concentration musculaire maximale était atteinte un mois après électrotransfert (42,47 ng de hTNFR-Is/mg de protéine). Les niveaux d'expression détectés diminuaient ensuite puis se stabilisaient à des valeurs proches de 1,00 ng de hTNFR-Is/mg de protéine pour les pCOR hTNFR-Is et pCOR (hTNFR-Is)2, et à environ 30,00 ng de hTNFR-Is/mg de protéine pour le pCOR hTNFR-Is/mIgG1 au moins jusqu'au sixième mois après électrotransfert.
La production de TNFR-Is dans le muscle controlatéral était, dans tous les cas presque nulle.

II.1.2-b) Expression dans le sérum

L'expression obtenue par dosage ELISA dans le sérum est représentée sur la figure 20 (partie droite). La protéine monomérique produite par le plasmide pCOR hTNFR-Is était détectée pendant deux semaines, avec un maximum d'environ 180 pg hTNFR-Is/mL sept jours après électrotransfert. L'évolution de la production de protéine par le plasmide pCOR (hTNFR-Is)2 était assez semblable ; elle atteignait un maximum entre sept et quatorze jours après électrotransfert, d'environ 310 pg/mL ; la protéine restait encore détectable jusqu'à un mois, et elle était encore détectée chez deux souris cinq mois après électrotransfert à des valeurs significatives (244 et 96 pg hTNFR-Is/mL). La protéine de fusion était, quant à elle, détectée pendant au mois six mois ; sa production par le pCOR hTNFR-Is/mIgG1 atteignait un maximum quinze à trente jours après électrotransfert, d'environ 16 500 pg hTNFR-Is/mL, puis décroissait régulièrement jusqu'au troisième mois, après lequel elle se stabilisait à environ 3 000 pg hTNFR-Is/mL.

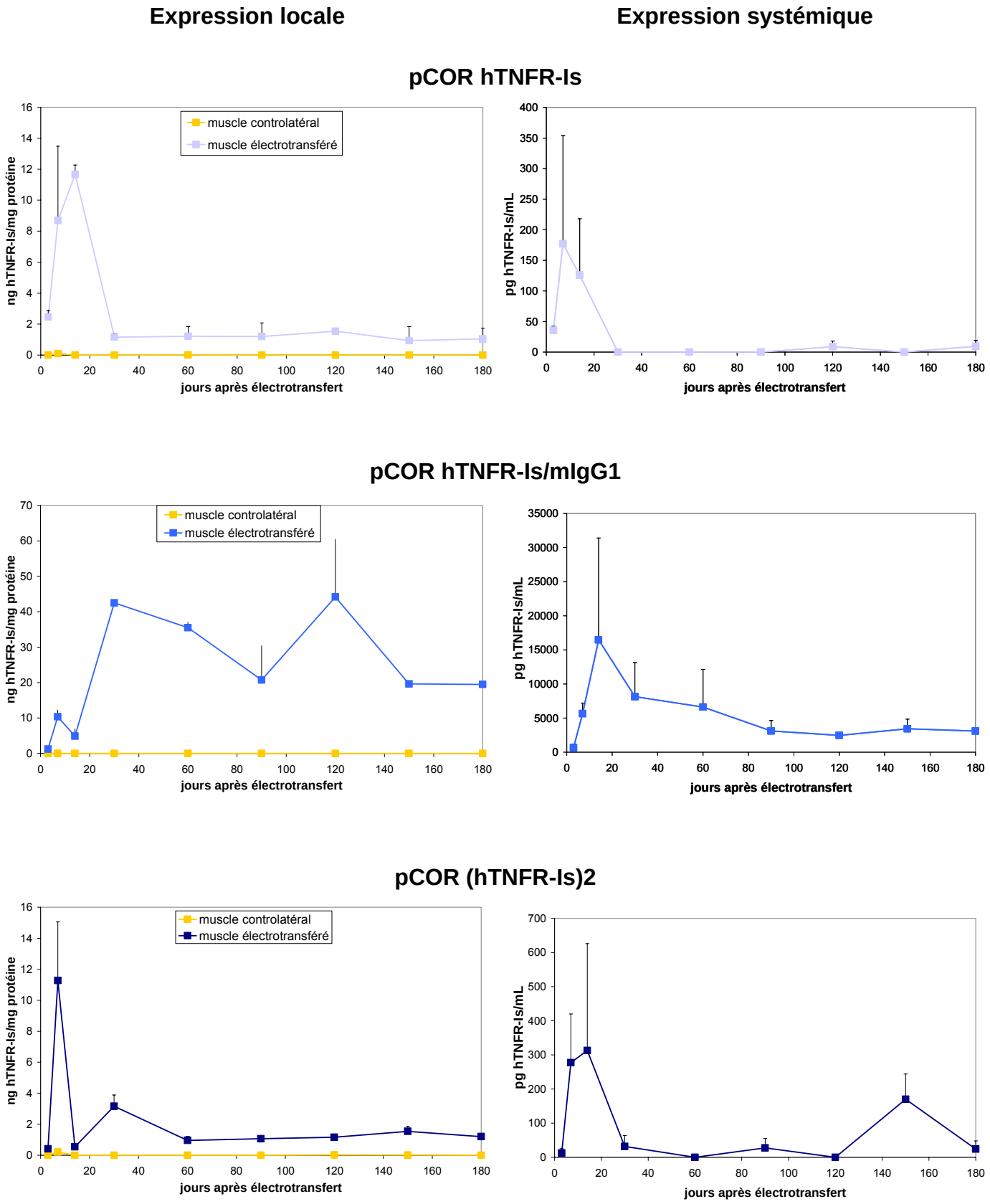


Figure 20 : Cinétique d'expression des variants du hTNFR-Is dans le muscle et dans le sérum après électrotransfert i.m 15 µg des plasmides pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1 ou pCOR (hTNFR-Is)2. Les concentrations de hTNFR-Is ont été déterminées par ELISA 3 jours, 7 jours, 14 jours, 1 mois puis tous les mois jusqu'à 6 mois après électrotransfert. Dans les muscles ou le sérum de souris électrotransférées avec le plasmide contrôle pCOR Vide, des valeurs non significatives de hTNFR-Is ont été détectées. (moyenne + SEM, n=2).

II.1.3 *Dissémination du vecteur*

Afin d'évaluer la diffusion du plasmide électrotransféré dans l'organisme *in vivo*, une étude par PCR avec des amorces spécifiques du plasmide pCOR, a été réalisée sur le triceps voisin du muscle électrotransféré, mais aussi dans différents organes situés à distance du site de l'injection : foie, rate, rein, cœur, poumon, cerveau (et gonades, non représentées sur la figure 21). Les organes prélevés pour cette manipulation proviennent des deux souris traitées pour l'étude cinétique avec 15 µg de plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1, et sacrifiées 14 jours après électrotransfert.
500 ng d'ADN génomique extraits à partir d'organes étaient utilisés pour réaliser une PCR à l'aide d'amorces spécifiques du plasmide pCOR. Une PCR était aussi effectuée avec des amorces du gène de l'actine afin de contrôler l'intégrité de l'ADN extrait.
La figure 21 montre que le plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1 n'était détecté que dans le triceps, muscle voisin du muscle tibial cranial injecté, mais dans aucun des organes situés à distance du site d'injection. Les résultats obtenus sont valables puisque l'ADN extrait était intact (le fragment actine était amplifié dans tous les échantillons), et que les conditions de PCR permettaient effectivement l'amplification du fragment pCOR.

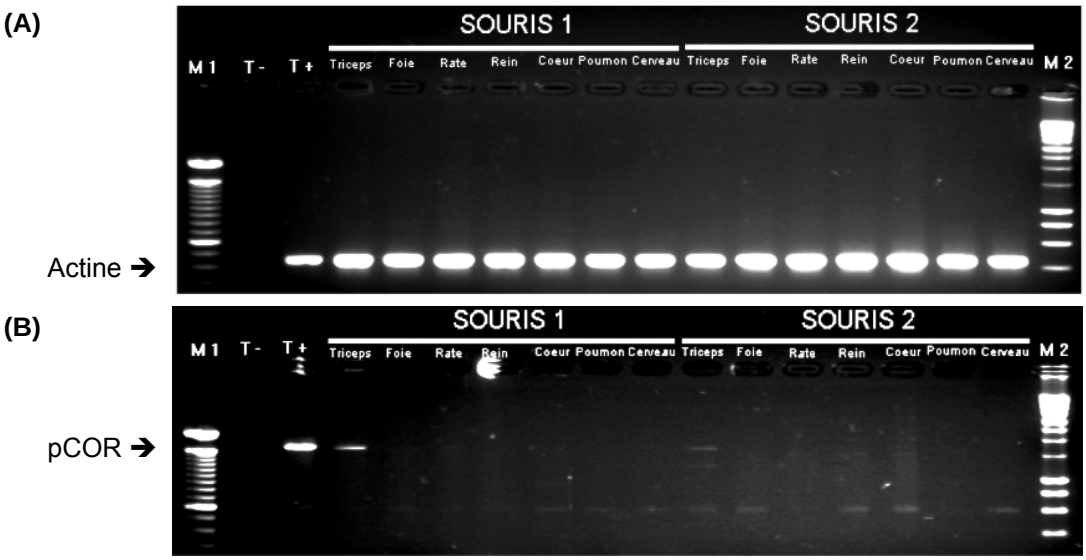


Figure 21 : Etude de la diffusion de plasmide après électrotransfert in vivo. Les organes étaient prélevés, sur deux souris, deux semaines après électrotransfert du muscle tibial cranial avec 15 µg de pCOR hTNFR-Is/mIgG1, puis une PCR, réalisée à partir d'ADN génomique extrait de divers organes (triceps, foie, rate, rein, cœur, poumon, cerveau), était effectuée. Les PCR visaient à amplifier un fragment actine (A), contrôle d'extraction d'ADN intact, et un fragment du plasmide pCOR (B).
M1 et M2 : marqueurs de taille
T - : témoin négatif (sans ADN)
T + : témoin positif d'hybridation des amorces (5 ng d'ADN extrait de la lignée DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1)

II.1.4 *Evaluation des anticorps anti-hTNFR-Is*

Les profils cinétiques de hTNFR-Is mettent en évidence une décroissance locale et sérique des taux de protéine monomérique et dimérique, après électrotransfert de 15 µg de plasmide pCOR. Nous avons donc envisagé la possibilité d'une réponse immune contre la protéine transgénique.
Les anticorps anti hTNFR-Is ont été évalués à l'aide d'un dosage ELISA spécifique des Ig totaux anti hTNFR-Is. Le sérum de souris DBA/1 naïves était utilisé comme "blanc" pour déterminer les titres en anticorps.

Le dosage a été effectué un mois après électrotransfert de 15 µg de plasmide pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2, et pCOR Vide chez des souris DBA/1. Aucun anticorps n'a été détecté chez ces animaux (n=4).
Nous avons ensuite contrôlé l'éventuelle présence d'anticorps chez les animaux traités par 2*25µg de plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1 dans le modèle de l'AEC, que nous avons utilisé pour évaluer l'efficacité thérapeutique des variants de hTNFR-Is (voir partie III.3). Le dosage a été réalisé 35 jours après électrotransfert, avec comme contrôle les souris de la même série d'expériences traitées par électrotransfert de solution saline. Aucun anticorps n'a été détecté à cette dose plus élevée de plasmide (n=5).

II.2. Electrotransfert intra-articulaire

L'électrotransfert intramusculaire des plasmides codant les variants du hTNFR-Is conduit à une expression élevée de protéine transgénique, pouvant permettre un effet thérapeutique. Cependant, nous souhaitions développer une stratégie locale de transfert de gènes anti-inflammatoires, dans le cadre des maladies articulaires, comme la PR.
La méthode d'électrotransfert intra-articulaire n'ayant jamais été utilisée précédemment au laboratoire, quelques séries d'expériences se sont avérées nécessaires afin de vérifier l'efficacité de la méthode, de localiser la/les zones transfectées et d'essayer d'identifier le type cellulaire transfecté. Deux études utilisant cette méthode chez le rat ont été publiées ; les résultats de ces travaux montrent la transfection de types cellulaires différents (cellules synoviales ou chondrocytes) et un profil cinétique différent[328,373].

II.2.1 *Validation de la méthode*

L'électrotransfert intra-articulaire est une méthode récemment mise au point. Son utilisation n'a été publiée que chez le rat. Au commencement de nos travaux, l'équipe de Christian Jorgensen (INSERM U475, Montpellier) avait réalisé des études afin d'optimiser les conditions d'électrotransfert utilisées pour le muscle tibial cranial pour un transfert de gène dans le genou de la souris.
Nous nous sommes fondés sur ces conditions électriques pour nos études. Nous avons néanmoins, dans un premier temps, contrôlé que la réalisation d'un électrotransfert permettait une réelle augmentation des niveaux de transfection, comparé à l'injection d'ADN nu. Cette étude a été réalisée à l'aide du gène rapporteur luciférase, et d'un dispositif d'imagerie par caméra CCD.
Nous avions traité six souris par injection dans chaque genou de 60µg (10µL) de plasmide pVAX2 luc. Une seule des deux articulations a été électrotransférée, l'autre ne recevait que le plasmide.
L'intérêt de l'analyse par imagerie optique *in vivo* est de pouvoir suivre le même lot d'animaux à des dates différentes sans les euthanasier.

La figure 22 met en évidence le réel intérêt de l'électrotransfert comparé à la seule injection de plasmide. Il permet d'augmenter l'expression de luciférase d'un facteur 380 et 640, respectivement deux et sept jours après électrotransfert. L'illustration en fausses couleurs d'une souris représentative de la manipulation montre aussi la forte expression observée (Figure 23).

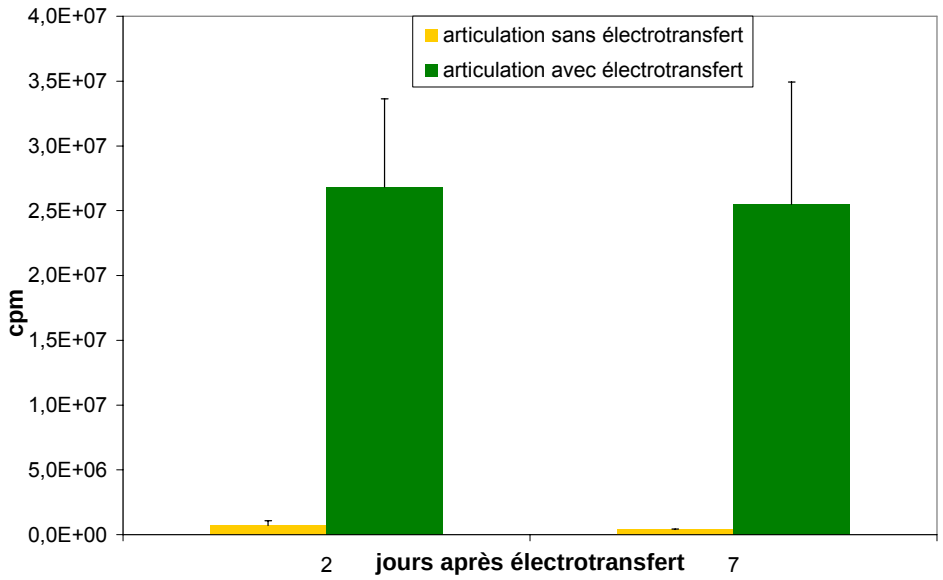


Figure 22 : Activité luciférase dans les articulations (genoux) des souris injectées avec 60 µg de plasmide codant la luciférase, avec ou sans électrotransfert. L'activité luciférase était mesurée par l'émission de luminescence à l'aide d'une caméra CCD sur l'animal anesthésié, et après injection locale (dans l'articulation) de 50µg/10µL de substrat luciférine. (moyenne + SEM, n=6).

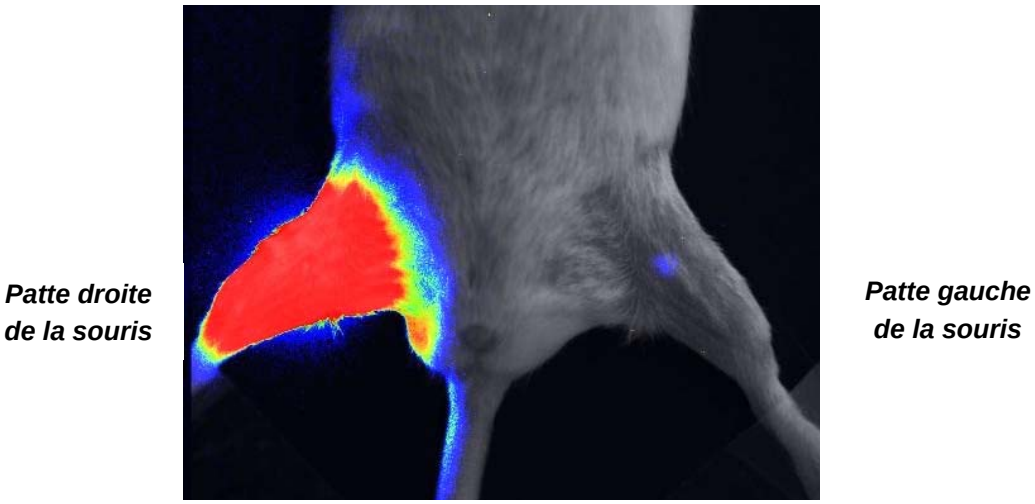


Figure 23 : Illustration en fausses couleurs des observations réalisées à l'aide de la caméra CCD en bioluminescence. 50µg/10µL de substrat luciférine étaient injectés dans chaque articulation de la souris anesthésiée. Le temps d'acquisition de la luminescence était de 2 minutes. Patte gauche : injection seule de 60µg de plasmide pVAX2 luc ; patte droite : injection + électrotransfert de 60µg de plasmide pVAX2 luc. La mesure a été réalisée sept jours après injection.

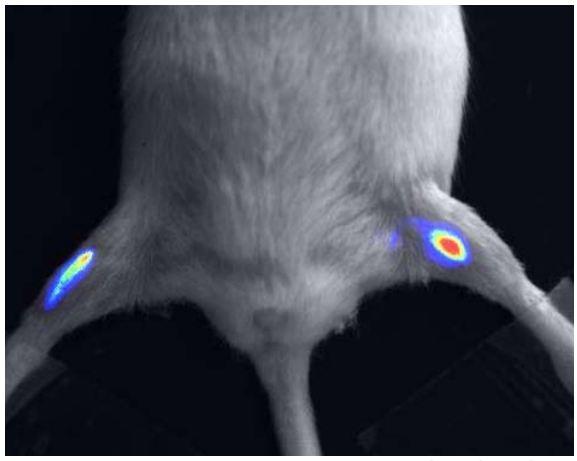
II.2.2 ***Localisation de l'expression par imagerie optique***

Nous avons utilisé la méthode d'imagerie optique du petit animal pour réaliser une première localisation de l'expression du transgène suite à injection et électrotransfert de l'articulation. L'utilisation du gène rapporteur fluorescent GFP a été tentée, mais les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la fluorescence de cette protéine sont dans une gamme très sensible à l'absorption par les tissus[374] ; ainsi, nous ne sommes pas parvenu à observer une émission de fluorescence, même avec injection et électrotransfert de 60µg de plasmide/articulation.

Nous avons donc utilisé le gène rapporteur luciférase, peu sensible à l'atténuation par les tissus. Cependant, la détection de luminescence ne permet pas de localiser très précisément le site transfecté[375].

Afin d'essayer de distinguer nettement le compartiment articulaire, par rapport au muscle tibial cranial classiquement utilisé en transfection, nous avions choisi, chez la même souris, de traiter une patte par injection et électrotransfert intramusculaire de 3µg de plasmide, et l'autre patte par injection et électrotransfert intra-articulaire de 60µg de plasmide. L'injection intrapéritonéale de substrat luciférine sept jours après électrotransfert permettait de visualiser l'expression du transgène dans les deux compartiments. Cette méthode ne permettait pas de localiser précisément l'expression après électrotransfert dans l'articulation, mais nous pouvions observer une zone d'expression très différente de celle obtenue après électrotransfert du muscle tibial cranial, et qui semblait bien localisée au niveau de l'articulation du genou.

Patte droite de la souris



Patte gauche de la souris

Figure 24 : Illustration en fausses couleurs des observations réalisées à l'aide de la caméra CCD en bioluminescence sept jours après électrotransfert du muscle tibial cranial droit de la souris avec 3µg de plasmide codant la luciférase, et électrotransfert du genou gauche avec 60 µg du même plasmide. La luminescence était observée après injection intrapéritonéale de substrat (2,5 mg/250µL). Le temps d'acquisition de la luminescence était de 2 minutes.

Pour obtenir une localisation précise de l'expression, une méthode invasive, par réalisation de coupes histologiques de pattes de souris doit être employée. Le gène rapporteur GFP a été utilisé pour effectuer des coupes histochimiques de pattes de souris après électrotransfert intra-articulaire du plasmide, mais la GFP n'a pu être visualisée. Nous envisageons désormais d'utiliser le gène rapporteur LacZ pour réaliser des colorations sur coupes.

II.2.3 ***Effet dose en hTNFR-Is***

Afin d'estimer les quantités de protéines solubles secrétées dans l'articulation, mais aussi dans la circulation, après électrotransfert intra-articulaire des variants du hTNFR-Is, différentes doses (5, 10, 20, 40 et 60 µg) de plasmide ont été injectées dans les deux articulations de souris DBA/1. Six jours après électrotransfert, le sang et les articulations des souris ont été prélevés. Les taux de hTNFR-Is ont été dosés dans le milieu d'incubation des articulations, et dans le sérum.

II.2.3-a) <u>Expression locale</u>

La méthode utilisée pour traiter les échantillons, par mise en culture des articulations prélevées dans du milieu de culture cellulaire permet d'évaluer véritablement la capacité de sécrétion de hTNFR-Is par les cellules articulaires transfectées. Cette concentration ne reflète pas la concentration intra-

articulaire réelle en hTNFR-Is, qui aurait pu être évaluée par dosage du liquide synovial lui-même ; cependant, le prélèvement du liquide synovial n'est pas réalisable chez la souris. Le résultat des dosages est représenté sur la figure 25.

Après injection et électrotransfert des variants du hTNFR-Is, la protéine d'intérêt était effectivement secrétée par les cellules transfectées, six jours après électrotransfert.

Les taux observés étaient nettement plus faibles pour la protéine dimérique (environ 50 pg/mL pour 5µg de plasmide électrotransféré et 230 pg/mL pour 20µg de plasmide électrotransféré), sans que nous ayons pu trouver une explication (expérience répétée avec une nouvelle préparation de plasmide, plasmide séquencé,…). Les protéines monomérique et chimérique étaient détectées à des taux voisins (environ 1730 pg/mL pour les deux formes par électrotransfert de 5µg de plasmide, 8800 pg/mL et 12000 pg/mL par électrotransfert de 40µg de plasmide codant les formes monomérique et chimérique respectivement), les deux types de protéine devant être stables au sein de l'articulation, et s'y accumulant de manière semblable.

Pour les trois variants étudiés, la production de protéine augmentait effectivement avec la quantité de plasmide injecté, pour les doses comprises entre 5 et 40 µg. Par contre, l'expression diminuait (non statistiquement significatif) pour la dose de 60 µg.

Cette légère baisse peut être liée à une saturation de pénétration du plasmide ou de production de protéine au sein du compartiment articulaire, comme cela a déjà été observé pour l'électrotransfert intramusculaire[350].

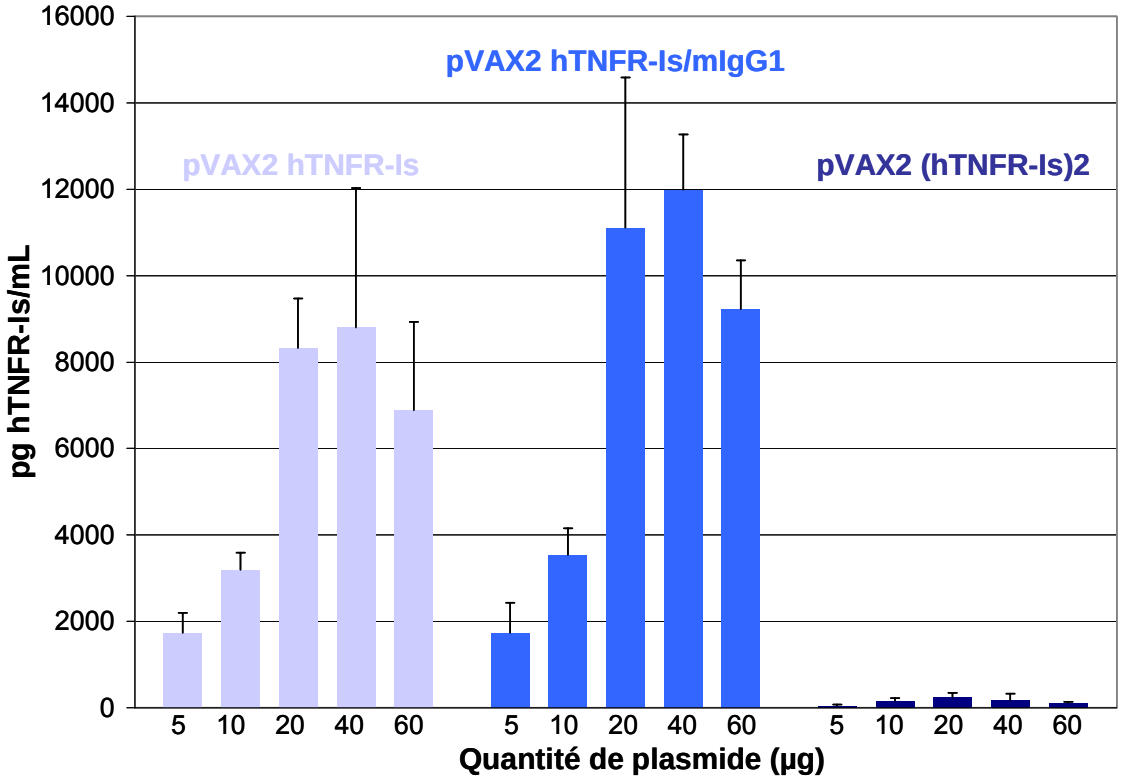


Figure 25 : Concentration en hTNFR-Is dans les articulations (rotule, synoviale, têtes du fémur et du tibia) électrotransférées 6 jours auparavant avec des doses croissantes (5, 10, 20, 40, 60 µg) de plasmide pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2, ou pVAX2 (contrôle). Les articulations prélevées étaient placées dans une plaque 96 puits, et mises en incubation 24 heures à 37°C dans 200µL de milieu RPMI. La concentration de hTNFR-Is était alors mesurée dans ces surnageants par ELISA. La concentration en hTNFR-Is dans les articulations électrotransférées avec le plasmide contrôle était en dessous du seuil de détection. (moyenne +SEM, n=6).

II.2.3-b) Expression systémique

Il était intéressant de déterminer l'expression sérique de hTNFR-Is obtenue après électrotransfert dans l'articulation. En effet, nous souhaitons utiliser ici une stratégie locale, et donc minimiser le passage de la protéine hTNFR-Is dans la circulation. Cependant, les molécules solubles peuvent facilement franchir la membrane synoviale, dépourvue de membrane basale ; il est donc important de connaître les taux sériques ainsi obtenus.

Les taux observés concernant la protéine dimérique, en accord avec la détection locale de la protéine, étaient très faibles. Par contre, les taux sériques obtenus après électrotransfert des deux autres variants étaient assez élevés (maximum de 550 et 3 600 pg/mL pour le monomère et la protéine de fusion respectivement). Comme nous l'avions observé pour la détection locale de la protéine, les taux de hTNFR-Is sériques augmentaient avec la quantité de plasmide électrotransféré pour les doses entre 5 et 20 ou 40 µg de plasmide (différence statistiquement significative pour la protéine de fusion entre 20µg et 40µg), et diminuaient légèrement pour 60 µg de plasmide.

Des taux importants observés après électrotransfert ne sont pas surprenants car les quantités de plasmide électrotransférées sont très importantes, et le passage de protéine dans la circulation n'est plus négligeable pour ces quantités de plasmide.

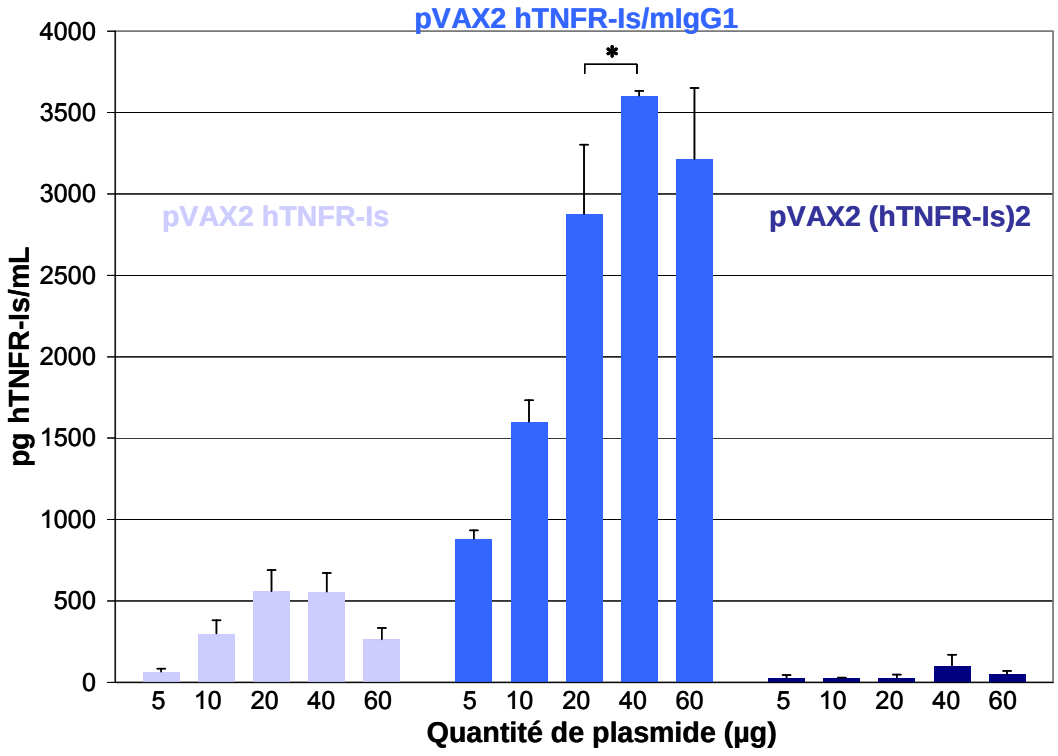


*Figure 26 : Concentration en hTNFR-Is dans le sérum de souris électrotransférées en intra-articulaire 6 jours auparavant avec des doses croissantes (5, 10, 20, 40, 60 µg) de plasmide pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2, ou pVAX2 (contrôle). La concentration de hTNFR-Is était évaluée par ELISA. La concentration en hTNFR-Is dans les prélèvements de sérum des souris électrotransférées avec le plasmide contrôle était en dessous du seuil de détection. (moyenne +SEM, n=6). * p<0,05 entre pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 à 20µg et 40µg (Mann-Whitney).*

II.2.4 *Etude cinétique*

Afin de déterminer la cinétique protéique suite à électrotransfert intra-articulaire chez la souris, nous avions choisi d'utiliser, dans un premier temps, le gène rapporteur de la luciférase, simple à analyser par système d'imagerie optique CCD. Il permet de réaliser l'ensemble de la cinétique sur le même lot d'animaux. Cette étude nous permet de déterminer le profil cinétique obtenu par notre méthode d'injection et d'électrotransfert intra-articulaire. En effet, les deux équipes ayant utilisé cette méthode chez le rat, ont obtenu des profils cinétiques assez différents.

II.2.4-a) Evaluation de l'expression de luciférase par imagerie optique

Nous avons injecté et électrotransféré des souris SWISS avec 60 µg de plasmide pVAX2 luc dans chaque genou. A différents temps après l'injection, l'expression du transgène était évaluée par imagerie optique. Les résultats des mesures réalisées sont présentés sur la figure suivante.

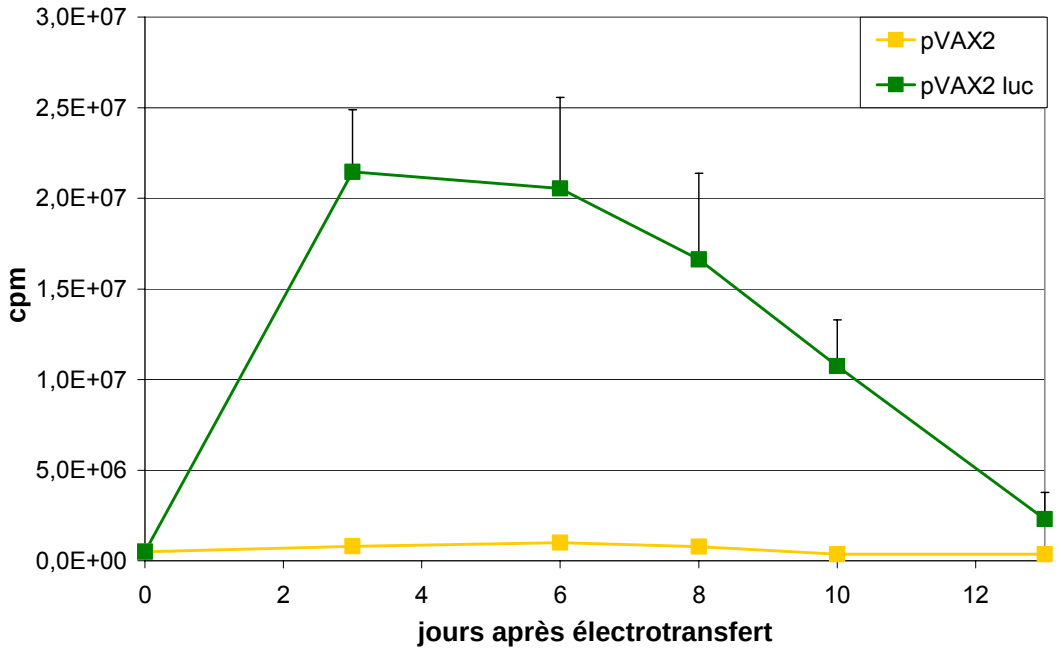


Figure 27 : Cinétique d'expression luciférase après électrotransfert intra-articulaire de 60µg de plasmide pVAX2 luc. Les mesures ont été réalisées 3, 6, 8, 10, et 13 jours après électrotransfert, sur le même lot de souris. (moyenne + SEM, n=8).

L'électrotransfert intra-articulaire de plasmide codant la luciférase permettait l'expression du transgène pendant environ deux semaines. La production de protéine atteignait un maximum entre 3 et 6 jours après électrotransfert, puis son taux décroissait pour retomber au niveau basal 13 jours après électrotransfert.

II.2.4-b) Etude des variants du hTNFR-Is

Afin de connaître la cinétique des variants du hTNFR-Is, locale (dans les genoux électrotransférés) et systémique (dans le sérum), nous avions injecté et électrotransféré des souris DBA/1 avec 40 µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2 ou pVAX2 en contrôle. Les animaux étaient sacrifiés à différents temps après l'injection ; les articulations et le sang étaient

prélevés. L'étude précédente à l'aide du gène rapporteur luciférase avait mis en évidence une expression du transgène pendant environ deux semaines (figure 27). Nous avions donc décidé de suivre l'expression des hTNFR-Is sur cette durée, avec des prélèvements 3, 6, 8, 10, et 14 jours après électrotransfert.
Toutes les expériences réalisées avec les gènes hTNFR-Is ont été effectuées chez des souris DBA/1 afin de se placer dans le fond génétique qui sera utilisé pour tester le potentiel thérapeutique de ces plasmides par électrotransfert intra-articulaire dans le modèle de l'arthrite expérimentale au collagène.

✓ ***Expression locale***

Les profils cinétiques obtenus sont en accord avec les résultats observés par utilisation du gène rapporteur luciférase ; l'expression atteignait un maximum local de sécrétion de protéine 8 jours après électrotransfert. L'expression maximale était obtenue avec la forme monomérique du hTNFR-Is à la valeur d'environ 25 ng/mL. Les maxima obtenus pour les protéines chimérique et dimérique étaient de 12 et 2 ng/mL, respectivement. L'expression chutait ensuite pour retomber au niveau basal environ 10 jours après électrotransfert pour les formes monomérique et dimérique, et 14 jours après électrotransfert pour la protéine fusionnée.

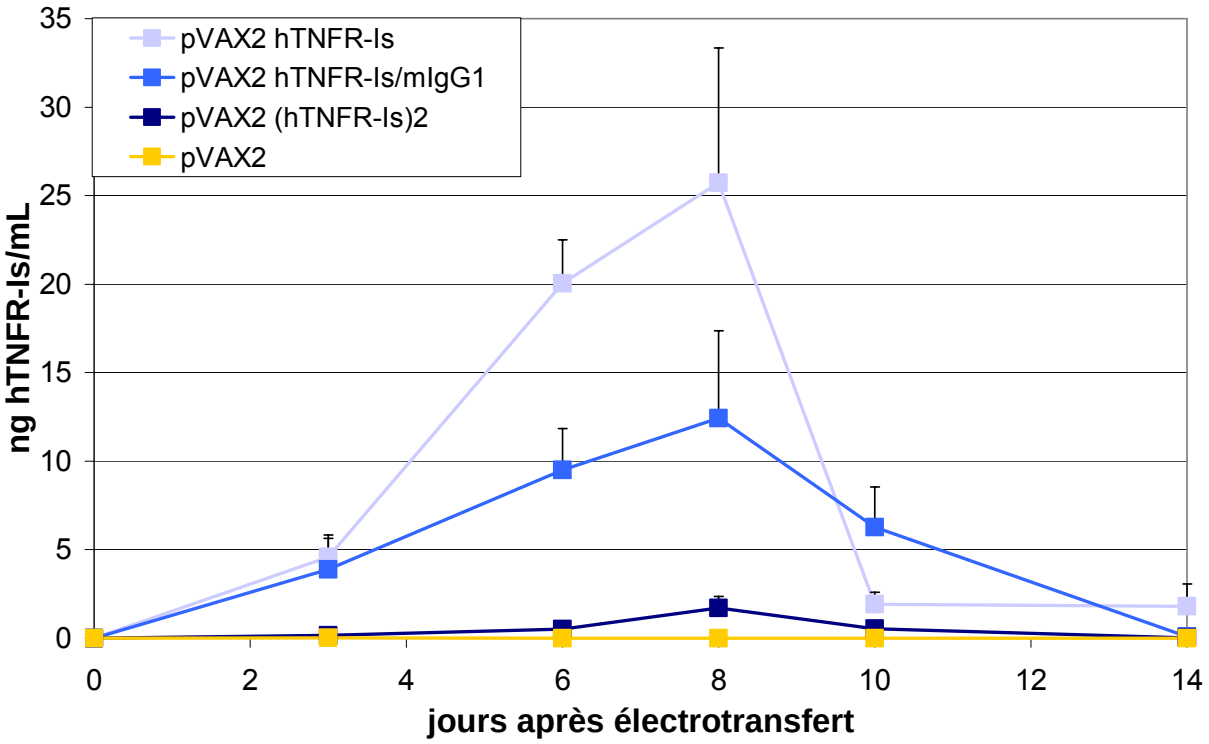


Figure 28 : Cinétique d'expression des variants du hTNFR-Is dans le genou après électrotransfert i.a de 40 µg par genou de plasmide pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2, ou pVAX2 (contrôle). Les articulations (rotule, synoviale, têtes du fémur et du tibia) prélevées étaient placées dans une plaque 96 puits, et mises en incubation 24 heures à 37°C dans 200µL de milieu RPMI. La concentration de hTNFR-Is était alors mesurée dans ces surnageants par ELISA. La concentration en hTNFR-Is dans les articulations électrotransférées avec le plasmide contrôle était en dessus du seuil de détection. (moyenne +SEM, n=6).

✓ ***Expression systémique***

L'expression obtenue par dosage ELISA dans le sérum est représentée sur la figure 29. Les protéines hTNFR-Is étaient détectées pendant les deux semaines de l'étude. Le maximum sérique était obtenu

8 jours après électrotransfert pour les trois variants étudiés. Les maxima étaient de 350 pg/mL, 520 pg/mL et 150 pg/mL pour les protéines monomérique, chimérique et dimérique respectivement.
Les valeurs sériques détectées quatorze jours après électrotransfert ne pouvaient pas être considérées significativement non nulles.

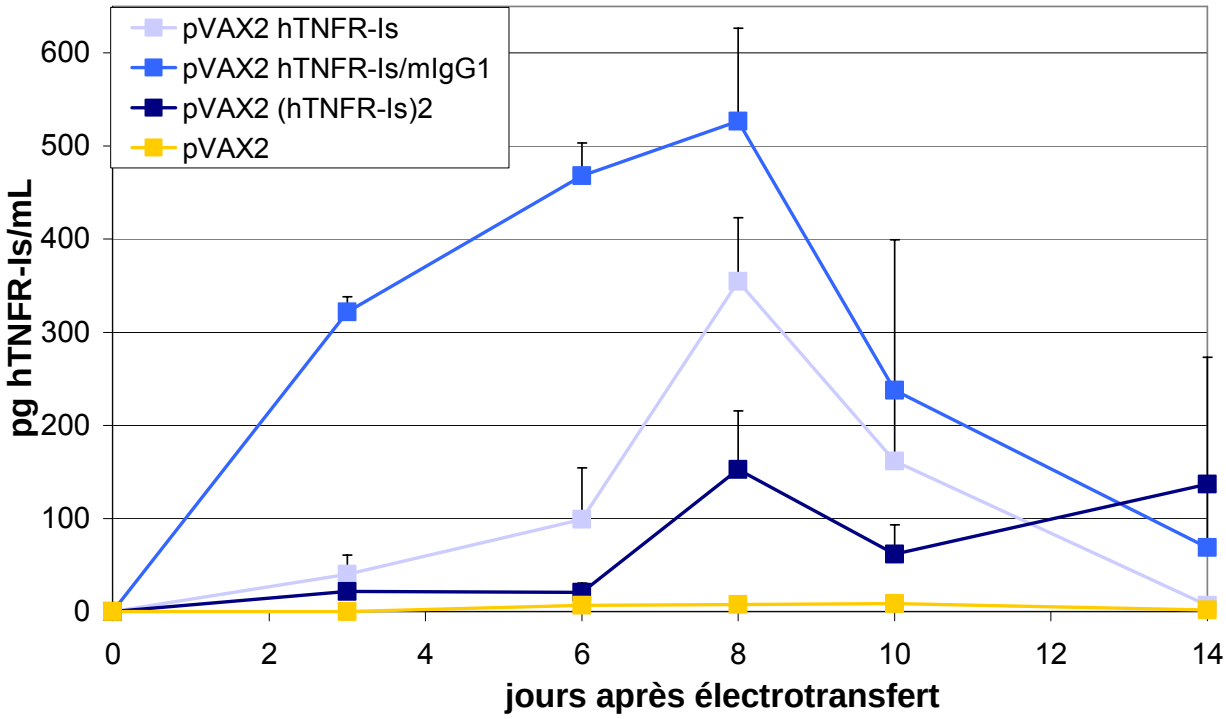


Figure 29 : Cinétique d'expression des variants du hTNFR-Is dans le sérum après électrotransfert i.a de 40 µg par genou de plasmide pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2, ou pVAX2 (contrôle). La concentration en hTNFR-Is dans les prélèvements de sérum des souris électrotransférées avec le plasmide contrôle était en dessus du seuil de détection. (moyenne +SEM, n=6).

II.2.4-c) Comparaison de l'expression chez des souris DBA/1 saines ou arthritiques

L'articulation de souris touchées par l'arthrite expérimentale au collagène est fortement modifiée ; en effet, les cellules synoviales prolifèrent, une angiogénèse est observée, et l'inflammation locale contribue à augmenter la perméabilité vasculaire. Ces différents paramètres pourraient contribuer à une augmentation de la transfection par électrotransfert intra-articulaire, les synoviocytes étant sans aucun doute ciblés par la procédure d'électrotransfert, et à un passage facilité de la protéine transgénique dans la circulation.
Cette étude a été réalisée sur des souris DBA/1 saines ou immunisées selon le protocole classique du modèle d'arthrite expérimentale au collagène. 40 jours après la première immunisation, soit environ deux semaines après l'apparition des signes cliniques de la maladie, nous avons injecté et électrotransféré des souris avec 40µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1. L'expression de hTNFR-Is locale et systémique a été évaluée sept jours après électrotransfert.

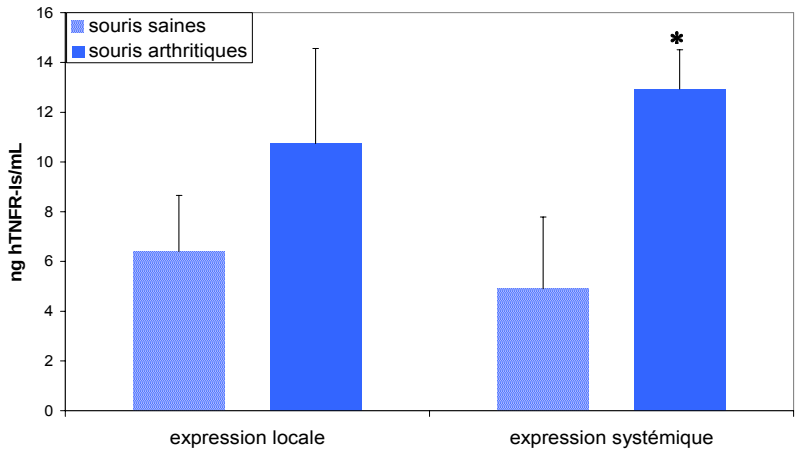


*Figure 30 : Expression locale et systémique de hTNFR-Is 7 jours après électrotransfert i.a de 40 µg par genou de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 chez des souris DBA/1 saines ou arthritiques ; l'électrotransfert était réalisé 40 jours après immunisation. (moyenne + SEM, n=3). * : p<0,02 versus souris saines (Mann-Whitney).*

Les résultats obtenus ne permettaient pas de mettre en évidence une différence d'expression locale de hTNFR-Is sept jours après électrotransfert entre des souris saines et des souris arthritiques. Par contre, le taux de protéine sérique était statistiquement plus élevé chez les souris arthritiques, comparé aux souris saines. Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de la vascularisation de l'articulation et de la perméabilité vasculaire chez les animaux arthritiques.

II.2.5 *Etude de la réponse immune*

II.2.5-a) Evaluation des anticorps anti hTNFR-Is

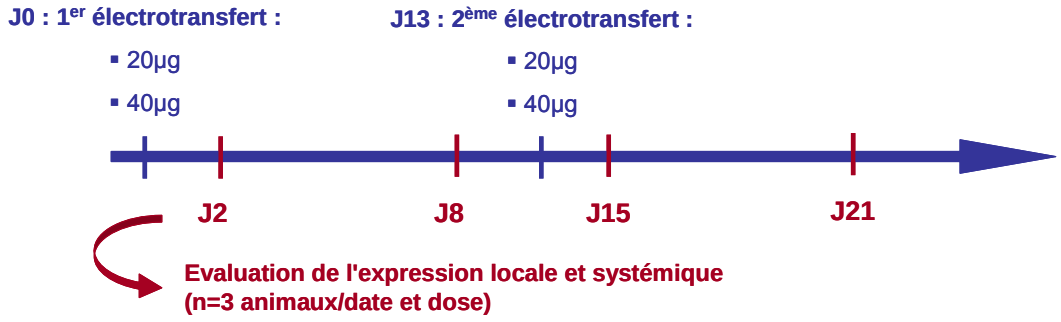
Les profils cinétiques obtenus suite à électrotransfert intra-articulaire mettent en évidence une décroissance locale et sérique assez rapide puisque environ deux semaines après électrotransfert, l'expression du transgène est retombée au niveau basal.
Nous avons donc souhaité contrôler si cette chute d'expression était liée à la présence d'anticorps contre la protéine transgénique.

Treize jours après électrotransfert de 60 µg de plasmide pVAX2 luc dans chacune des deux articulations de souris SWISS, le sérum des animaux était prélevé, et la présence d'anticorps Ig totaux dirigés contre la luciférase a été évaluée à l'aide d'un dosage ELISA spécifique de la protéine. Le sérum de souris SWISS naïves était utilisé comme "blanc" pour déterminer les titres en anticorps. Des forts titres d'anticorps comparés au sérum naïf (supérieur ou très supérieur à 200) ont été obtenus pour tous les animaux évalués (n=4).
Nous avons donc évalué le même type de réponse immune chez les souris DBA/1 électrotransférées avec 40 µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2 et pVAX2 (contrôle) dans chacune des deux articulations, huit, dix, et quatorze jours après électrotransfert (n=3/date). Les anticorps ont été évalués à l'aide d'un dosage ELISA spécifique des Ig totaux dirigés contre le hTNFR-Is, et avec du sérum de souris DBA/1 naïves comme contrôle. Les souris considérées comme immunoréactives avaient un titre en anticorps supérieur ou très supérieur à 200.
Une seule souris traitée par électrotransfert du plasmide codant la forme monomérique de hTNFR-Is présentait des anticorps quatorze jours après électrotransfert. Parmi les souris traitées avec le plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, toutes présentaient un taux élevé d'anticorps dix et quatorze jours après électrotransfert. Sur les trois dates étudiées, aucune souris traitée par le plasmide codant la forme dimérique du hTNFR-Is n'exprimait des anticorps anti hTNFR-Is.
Pour un même transgène, la réponse immune humorale observée est donc différente selon la construction utilisée. Or, nous avons observé des profils cinétiques semblables pour les trois variants

du hTNFR-Is (avec un taux d'expression locale et sérique plus faible pour la protéine dimérique), et pour la protéine intracellulaire luciférase. D'autres facteurs doivent donc sans doute être responsable de la décroissance d'expression observée, comme par exemple les divisions des cellules transfectées ou une répression du promoteur du transgène.

II.2.5-b) Expression de hTNFR-Is suite à un second électrotransfert

L'expression obtenue par électrotransfert intra-articulaire est à relativement court terme puisque deux semaines après les injections, les taux local et sérique de protéines sont retombés au niveau basal. Il faudrait donc, dans le cadre d'une application au modèle de l'arthrite expérimentale au collagène et afin d'obtenir un effet à long terme, effectuer deux séries d'électrotransfert intra-articulaire, à une dizaine de jours d'intervalle.
Or une réponse immune humorale a été observée par électrotransfert de 40µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 dans chaque articulation de la souris. Ces anticorps devraient empêcher de réinduire la production de protéine thérapeutique après un second électrotransfert. Par ailleurs, nous avons observé des taux local et sérique de hTNFR-Is assez semblables pour les doses de 20µg et 40µg de plasmide.
Nous avons donc voulu contrôler si la réalisation d'un second électrotransfert, 13 jours après un premier traitement, permettait de réinduire l'expression de la protéine thérapeutique hTNFR-Is/mIgG1 ; les deux doses de plasmide 20µg et 40µg ont été étudiées, et les taux de protéine locale et systémique ont été évalués deux et huit jours après chaque électrotransfert.



Les résultats obtenus (Figure 31) montrent qu'il n'est pas possible de réinduire l'expression de protéine de fusion par un second électrotransfert de 40 µg de plasmide par articulation. En effet, les expressions locale et sérique obtenues 15 et 21 jours après le premier électrotransfert (soit 2 et 8 jours après le second électrotransfert) étaient très faibles. L'évaluation des anticorps anti hTNFR-Is chez ces mêmes animaux était cohérente avec ces résultats car on observait un taux élevé d'anticorps chez toutes les souris suite au second électrotransfert (titre supérieur ou très supérieur à 200).

Par contre, à la dose de 20 µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 par articulation, la réalisation d'un second électrotransfert avec la même dose de plasmide 13 jours après le premier traitement est intéressante. Une forte réinduction de l'expression locale dans les articulations traitées était ainsi observée deux jours après le second traitement et permettait d'atteindre environ 3000 pg de hTNFR-Is/mL ; cette expression restait élevée huit jours après le second électrotransfert. L'expression sérique de hTNFR-Is était elle aussi réaugmentée suite au deuxième traitement (environ 130 pg de hTNFR-Is/mL à J15) mais elle chutait plus rapidement et était nulle à J21. L'évaluation des anticorps anti hTNFR-Is chez ces animaux mettait en évidence un titre élevé d'anticorps, après le second électrotransfert uniquement chez une souris sur trois à J15 et J21.

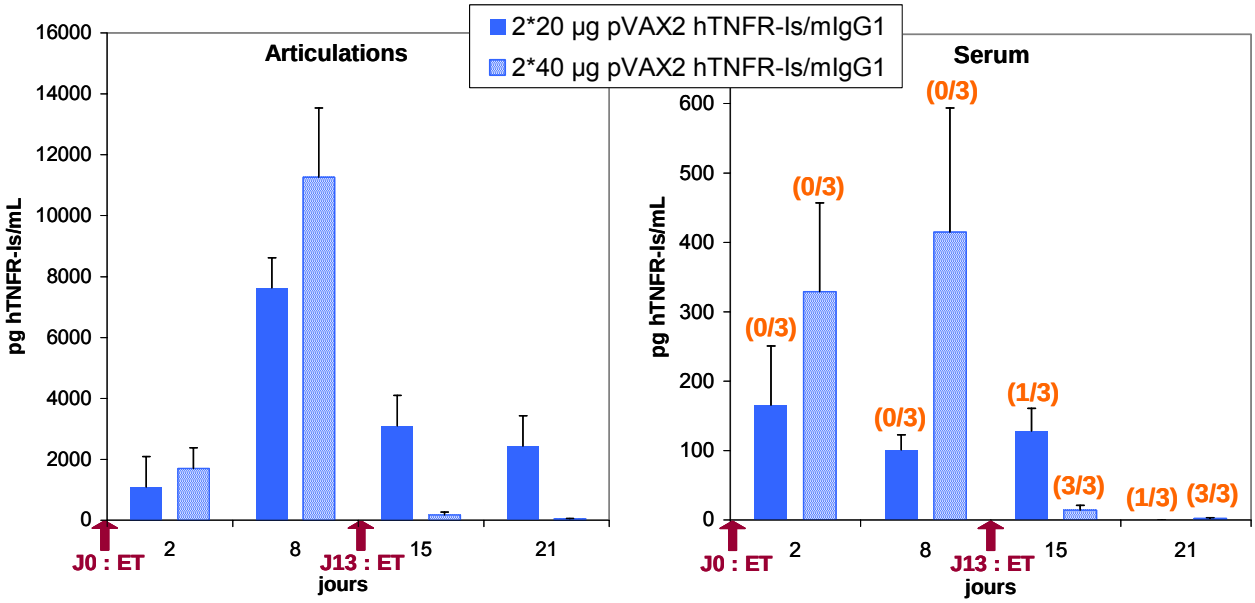


Figure 31 : Expression locale (articulation) et systémique (sérum) de hTNFR-Is 2, 8, 15, et 21 jours après électrotransfert (ET) de 20 µg ou 40 µg par genou de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 à J0 et à J13 chez des souris DBA/1. Les données précisées en orangé correspondent au nombre de souris présentant un taux élevé d'anticorps à cette date. (moyenne + SEM, n=3).

L'utilisation de la dose de 20 µg de plasmide par articulation semble donc à privilégier ; en effet le taux de protéine de fusion hTNFR-Is/mIgG1 obtenu à cette dose reste élevé, et assez proche de celui obtenu par électrotransfert de 40µg de plasmide. Il est de plus possible de réinduire l'expression de récepteur soluble par un second électrotransfert, l'induction d'une réponse immune humorale contre la protéine trangénique restant limitée.

II.3. Electrotransfert intra-oculaire

L'œil est un organe difficile à traiter, du fait de la difficulté d'atteindre l'intérieur de l'organe, et du manque d'efficacité des traitements classiques reposant pour la plupart sur des instillations. Ces dernières années ont vu le développement de l'électrotransfert intra-oculaire. Pour le moment les cellules cibles sont principalement les cellules rétiniennes[317,376,377], les cellules de la cornée[316,378,379] ou de la conjonctive[380].

Nous pensions que des cellules cibles intéressantes seraient non neuronales, faciles à atteindre, avec un fort potentiel de transfectabilité et de longévité. Nous avons donc choisi d'évaluer la faisabilité de l'électrotransfert des myofibres du muscle ciliaire, qui n'est pas un muscle squelettique mais un muscle lisse.

II.3.1 *Efficacité de la méthode et localisation de l'expression du transgène*

Afin de contrôler qu'il y a bien expression du transgène après électrotransfert, et de visualiser la localisation de cette expression, nous avons utilisé le gène rapporteur GFP, et effectué des coupes immunohistochimiques (travaux réalisés par l'équipe de Francine Behar-Cohen, INSERM U598, Paris). 3µg de plasmide pEGFP-C1 ont été injectés dans le muscle ciliaire du rat, ou ont été injectés et suivis d'un électrotransfert. Les prélèvements ont été effectués huit jours après les injections. Les coupes permettaient de visualiser la localisation de la protéine GFP, et la réalisation

d'immunomarquage au DAPI permettait de visualiser les noyaux cellulaires. Un immunomarquage a aussi été effectué pour révéler l'actine des fibres musculaires lisses (anti-α-sm-1).
Nous avons ainsi observé un signal GFP très net dans les deux types de fibres du muscle ciliaire : les fibres longitudinales et circulaires. Cette fluorescence était colocalisée avec l'immunomarquage anti-actine des fibres musculaires lisses. L'électrotransfert réalisé permettait donc d'obtenir une transfection cellulaire efficace, et celle-ci était bien localisée au niveau du muscle ciliaire.

Les coupes réalisées en contre coloration hématoxyline-éosine montraient qu'il n'y a pas de dommages liés à la procédure d'électrotransfert, 8 jours après sa réalisation. Une légère infiltration cellulaire était observée au niveau du site d'injection. L'examen clinique des yeux le jour de l'électrotransfert ou 8 jours après n'a pas permis d'observer des signes d'inflammation ou de brûlure liés aux impulsions électriques.
La méthode ainsi réalisée semble efficace et sûre.

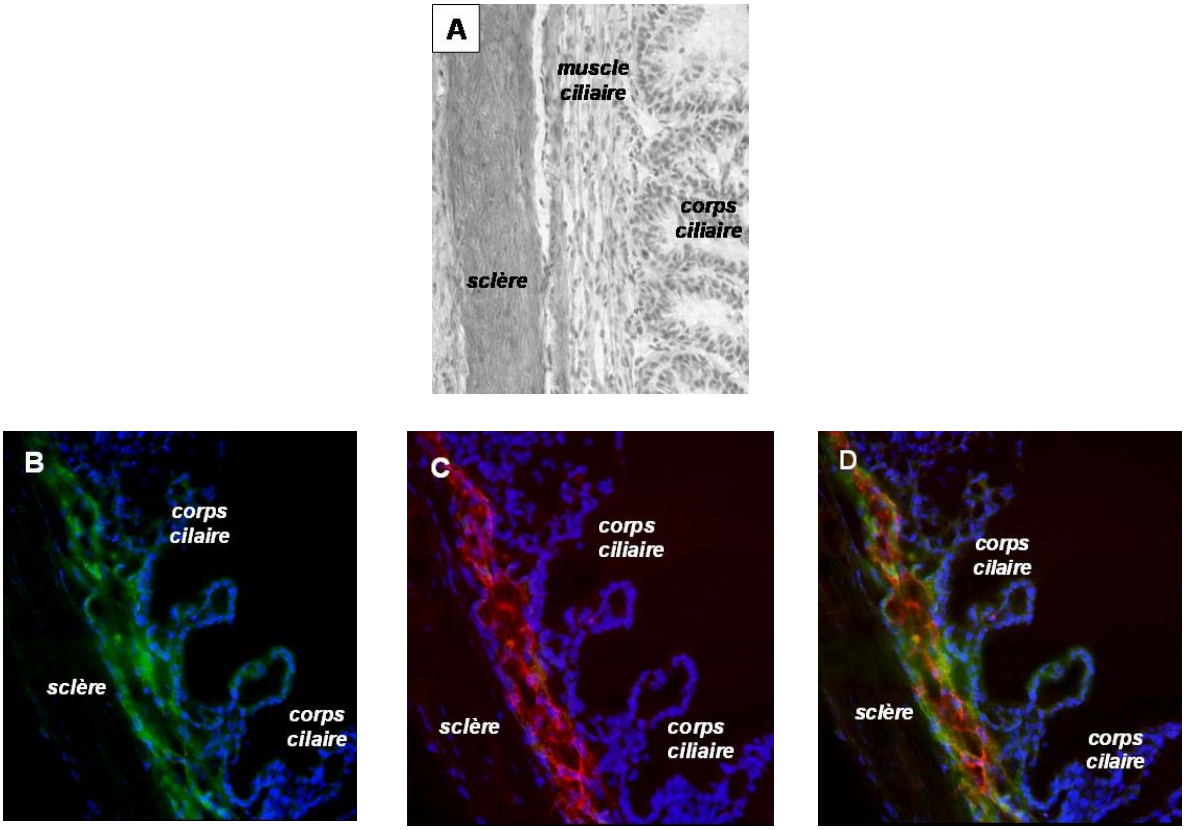


Figure 32 : Exemple de sections frontales antérieures de la région ciliaire.
A : Histologie hématoxyline-éosine des fibres circulaires du muscle ciliaire.
B : Immunochimie de la GFP (vert). Les noyaux sont colorés en bleu au DAPI.
C : Immunohistochimie de l'actine des fibres musculaires du muscle ciliaire (rouge). Les noyaux sont colorés en bleu au DAPI.
D : Colocalisation de l'actine des fibres musculaires (rouge) et de la GFP (vert) mettant en évidence la localisation de la GFP dans les fibres du muscle ciliaire. Les noyaux sont colorés en bleu au DAPI.

II.3.2 ***Etude cinétique***

Un suivi cinétique de l'expression dans le muscle ciliaire a été réalisé en utilisant le gène rapporteur luciférase, à la dose de 3µg. L'œil controlatéral recevait une injection seule de 3µg de pVAX2 luc.
L'expression a été suivie pendant un mois et les résultats sont présentés sur la figure 33.
La détection de luciférase dans le muscle ciliaire, dosée *ex vivo* dans les lysats de muscle ciliaire, à l'aide d'un luminomètre, était maximale à la première mesure effectuée, soit 5 jours après

électrotransfert. Elle décroissait ensuite jusqu'au 22ème jour après électrotransfert, et semblait se stabiliser entre le 22ème et le 30ème jour après électrotransfert. Cependant une étude à plus long terme serait nécessaire pour confirmer l'obtention d'un "pallier" de production de protéine, ou vérifier si la décroissance protéique est simplement ralentie.

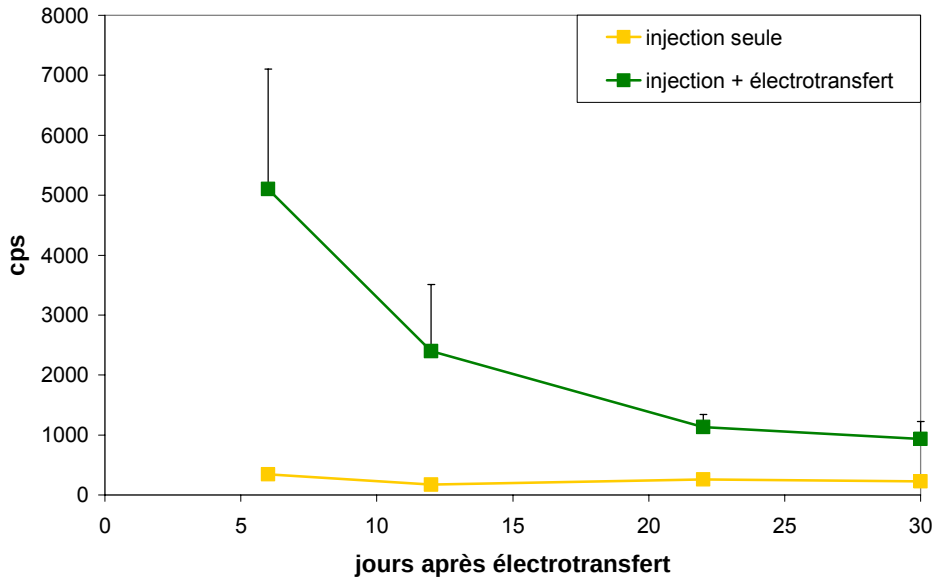


Figure 33 : Cinétique d'expression luciférase après électrotransfert dans le muscle ciliaire de 3µg de plasmide pVAX2 luc. Les mesures ont été réalisée 6, 12, 22, et 30 jours après électrotransfert, sur des lysats de muscle ciliaire, à l'aide d'un luminomètre. (moyenne + SEM, n=5).

II.3.3 ***Expression de hTNFR-Is***

La méthode d'électrotransfert dans le muscle ciliaire étant réalisable, nous nous sommes intéressés à la capacité de sécrétion des fibres musculaires transfectées dans l'humeur aqueuse (HA). Dans ce but, le muscle ciliaire était injecté avec 30µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 suivi ou non d'un électrotransfert. Sept jours après les injections, l'humeur aqueuse et le sérum des animaux étaient prélevés.

Nous avons ainsi obtenu une expression moyenne de hTNFR-Is de 274 ± 39 pg/mL pour les animaux traités par injection seule de 30µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, et de 691 ± 121 pg/mL pour les animaux traités par injection suivie d'un électrotransfert de la même dose de plasmide. Le taux de hTNFR-Is détecté dans l'humeur aqueuse des yeux controlatéraux non traités était considéré inférieur au seuil de détection du kit utilisé (15 ± 11 pg/mL). Aucun hTNFR-Is n'a été détecté dans l'humeur aqueuse des yeux naïfs (moyenne + SEM, n=6/groupe).

Nous avons aussi évalué le taux circulant de hTNFR-Is qui était, dans tous les groupes, inférieur au seuil de détection du dosage ELISA utilisé. Il n'y a donc pas de diffusion significative de la protéine transgénique.

Le muscle ciliaire est par conséquent capable de sécréter la protéine de fusion hTNFR-Is/mIgG1. L'injection seule de plasmide permet une expression non négligeable de protéine, mais l'électrotransfert permet d'obtenir des taux assez élevés (691 ± 121 pg/mL), qui pourraient être intéressants pour une approche thérapeutique.

III. Potentialité thérapeutique des variants par électrotransfert

III.1. Traumatisme cérébral

Nous avons voulu tester le potentiel thérapeutique des variants du hTNFR-Is dans le modèle de trauma diffus utilisé par le groupe de M. Plotkine (UPRES EA2510, Laboratoire de Pharmacologie, faculté de pharmacie Paris V), dans lequel une ouverture de la BHE est observée durant les six premières heures suivant l'induction du traumatisme[381]. L'électrotransfert intramusculaire n'est certes pas la méthode la plus efficace pour délivrer un traitement dans le cerveau, mais notre étude avait plusieurs objectifs : étudier si suite à un traumatisme crânien, les protéines d'intérêt sont capables de franchir la barrière hémato-encéphalique pour atteindre leur cible ; évaluer si une stratégie systémique est envisageable ; utiliser la méthode d'électrotransfert i.m comme un moyen rapide de "screener" une protéine d'intérêt sans être obligé de produire la protéine recombinante.

III.1.1 *Cinétique de production du TNF-α*

La littérature met en évidence la détection de TNF-α locale suite à un traumatisme crânien. Cependant, cette production dépend du type de modèle utilisé, et il est donc nécessaire de bien établir le profil cinétique de TNF-α suite au trauma dans le modèle que nous souhaitions utiliser. Ce modèle permet une étude sur un temps assez court après le traumatisme, car les souris récupèrent ensuite en grande partie leurs capacités motrices. Nous avons donc suivi la production de TNF-α sur 48 heures. Le traumatisme occasionné chez les souris est diffus, il est donc intéressant de contrôler l'expression de médiateurs inflammatoires dans la zone de contrecoup du choc (zone controlatérale).
Nous avons observé une expression très élevée de TNF-α local dans la zone du choc et controlatérale, avec un maximum une heure après l'induction de la lésion (39 et 32 ng/g cerveau, respectivement). Le maximum sérique était détecté 3 heures après le trauma (3,2 ng/mL), mais restait élevé jusqu'à 48 heures.

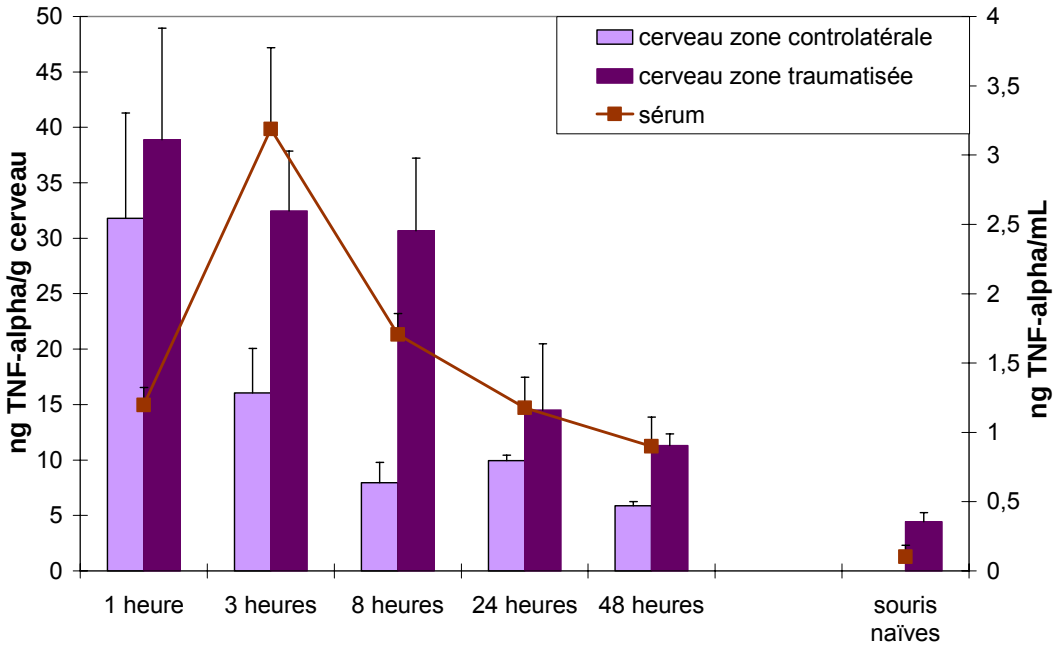


Figure 34 : Cinétique du TNF-α dans la zone du traumatisme crânien, la zone controlatérale, et le sérum, quantifiée par ELISA 1, 3, 8, 24, et 48 heures après induction du traumatisme crânien. (moyenne + SEM, n=5).

III.1.2 ***Modèle de traumatisme cérébral diffus***

D'après la cinétique de TNF-α précédente, nous avons décidé de centrer notre étude aux temps 3 heures et 24 heures après l'induction du traumatisme crânien. Afin d'obtenir une sécrétion optimale de protéine thérapeutique au moment du traumatisme, l'électrotransfert intramusculaire des plasmides pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2, et NaCl en contrôle, à la dose de 25 µg/muscle dans les deux muscles tibiaux craniaux des souris, était réalisé 8 jours avant le trauma.
Nous avons effectué une expérience préliminaire afin de vérifier que ni le traitement par électrotransfert sur des souris d'environ 12g, ni la production de hTNFR-Is n'avait d'effet sur le développement (masse) et le score neurologique des souris. Par ailleurs, nous n'avons pas détecté de hTNFR-Is dans le cerveau des souris non traumatisées (non montré).
Dans chaque expérience, nous avons contrôlé l'expression locale et la sécrétion dans la circulation de hTNFR-Is au sacrifice. Nous avons étudié l'effet des différents traitements sur la récupération des fonctions motrices des souris (évaluation clinique) 3 heures et 24 heures après le trauma. Nous avons aussi évalué les taux local et sérique de TNF-α, l'œdème cérébral, et suivi les évolutions de température et de masse des animaux.

Deux séries d'expériences ont été effectuées.

III.1.3 ***Etude des trois variants du hTNFR-Is***

La première expérience a été réalisée avec les trois variants de hTNFR-Is. En effet, les données de la littérature concernant l'utilisation de récepteur soluble du TNF-α dans les modèles animaux de traumatisme crânien diffèrent selon les modèles[83,382], nous ne savions donc pas si la forme fusionnée hTNFR-Is/mIgG1 serait capable de passer la BHE après le traumatisme. Par contre, les formes monomérique et dimérique du hTNFR-Is devaient l'être lors de l'ouverture de la BHE car ces variants sont plus petits, mais nous avons vu qu'elles sont moins stables dans la circulation, et nous souhaitions évaluer leur capacité à atteindre un site inflammatoire intracérébral.

Les groupes réalisés sont les suivants (n=20, avant induction du traumatisme) :
- Naïf : sans injection ni électrotransfert ni trauma
- Sans injection ni électrotransfert + trauma
- Électrotransfert de 2*30µl de NaCl 150mM + trauma
- Électrotransfert de 2*25 µg de pVAX2 hTNFR-Is + trauma
- Électrotransfert de 2*25 µg de pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 + trauma
- Électrotransfert de 2*25 µg de pVAX2 (hTNFR-Is)2 + trauma

Les souris étaient traitées huit jours avant l'induction du traumatisme crânien.

III.1.3-a) <u>Détection de hTNFR-Is local</u>

Les expressions musculaire et systémique de hTNFR-Is ont été contrôlées et sont en accord avec celles attendues par électrotransfert intramusculaire de 2*25µg de plasmide, pour chacun des variants.

Nous avons dosé le hTNFR-Is dans des carottes de cerveau, prélevées dans la zone du traumatisme, ainsi que dans la zone controlatérale.
Comparé aux animaux contrôles sans injection ou ayant reçu un électrotransfert de solution saline, le taux de hTNFR-Is mesuré chez les animaux traités à l'aide des plasmides codant les hTNFR-Is était plus élevé.

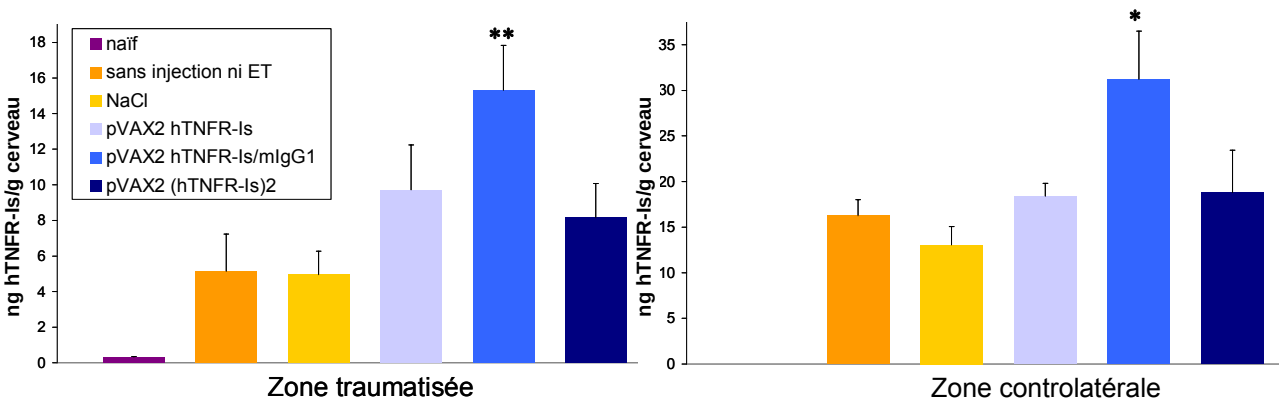


*Figure 35 : Taux de hTNFR-Is dans la zone du traumatisme crânien ou la zone controlatérale 24 heures après le trauma. Les souris étaient traitées par injection et électrotransfert de plasmide pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2, ou NaCl. Un groupe contrôle était laissé sans injection ni électrotransfert (ET) avant induction du trauma, et un autre groupe était laissé naïf. Le trauma était réalisé huit jours après les traitements. Les mesures étaient réalisées sur une carotte de cerveau, par dosage ELISA. (moyenne + SEM, n=11 à 13, sauf groupe naïf n=20). * : p< 0,05 versus NaCl ; ** : p<0,01 versus NaCl (Mann-Whitney).*

Les taux locaux de hTNFR-Is mettaient en évidence un bruit de fond assez élevé dans les échantillons prélevés. Le taux de hTNFR-Is n'était significativement différent, par rapport aux animaux contrôles électrotransférés avec la solution saline, que pour la construction codant la protéine de fusion. Les deux autres formes étudiées n'étaient pas clairement détectées dans le cerveau. Ces deux formes sont pourtant plus petites que la protéine fusionnée, et sont donc capables de franchir la BHE si la protéine fusionnée l'est. Cependant, leur stabilité sérique est très différente, la protéine chimérique étant nettement plus stable que les formes monomère et dimère. Cette différence de stabilité peut expliquer les différences observées ; en effet, les protéines monomère et dimère peuvent être dégradées avant d'atteindre le cerveau.

III.1.3-b) Détection de TNF-α local et systémique

Nous avons voulu évaluer les taux de TNF-α local (zone traumatisée et controlatérale) et systémique, pour contrôler si l'inflammation induite par le trauma reste localisée ou non, et évaluer si l'électrotransfert de plasmide codant des variants du hTNFR-Is permet d'inhiber les taux de TNF-α, au niveau local et/ou systémique.

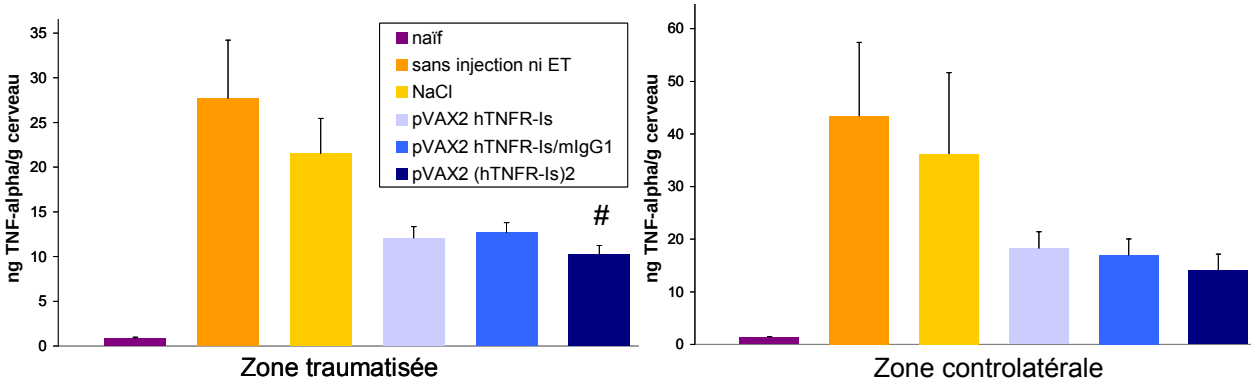


Figure 36 : Taux de TNF-α dans la zone du traumatisme crânien ou la zone controlatérale 24 heures après le trauma. Les souris étaient traitées par injection et électrotransfert de plasmide pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2, ou NaCl. Un groupe contrôle était laissé sans injection ni électrotransfert (ET) avant induction du trauma, et un autre groupe était laissé naïf. Le trauma était réalisé huit jours après les traitements. Les mesures étaient réalisées sur une carotte de cerveau, par dosage ELISA. (moyenne + SEM, n=11 à 13, sauf groupe naïf n=20). # : p< 0,005 versus NaCl (Mann-Whitney).

La présence de TNF-α chez les animaux non injectés ou traités par une solution saline confirme l'existence d'une inflammation locale post-traumatique. Cette inflammation, en accord avec le caractère diffus du modèle, était aussi détectée dans la zone controlatérale à la zone du traumatisme. Dans la zone de l'impact, les trois formes de hTNFR-Is étudiées permettaient une inhibition de TNF-α par rapport à l'électrotransfert de solution saline, celle-ci n'étant statistiquement significative que pour la forme dimérique. Dans la région controlatérale, cette inhibition n'était pas statistiquement significative, mais la tendance était aussi bien visible.
On remarque que les taux de TNF-α étaient plus élevés dans la zone controlatérale, qui est *a priori* moins hémorragique. La circulation dans cette région est donc "moins rapide" que dans la zone du traumatisme ; le débit de TNF-α y est plus faible, d'où une quantité plus importante de TNF-α qui s'y accumule.

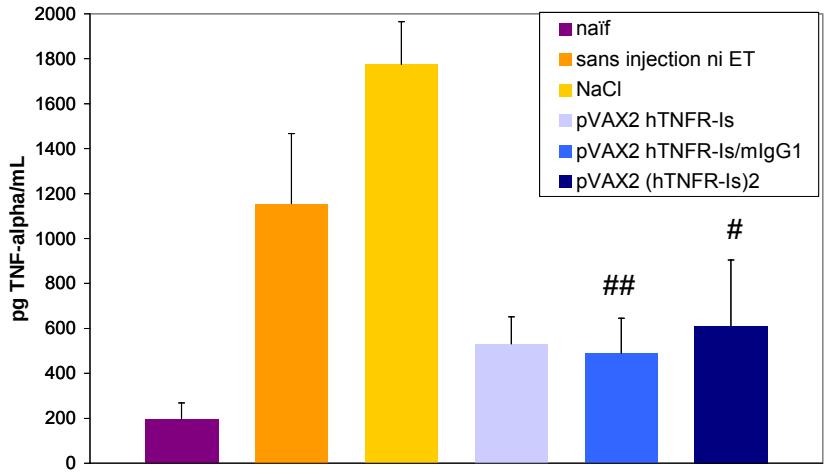


Figure 37 : Taux circulant de TNF-α 24 heures après le trauma. Les souris étaient traitées par injection et électrotransfert de plasmide pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2, ou NaCl. Un groupe contrôle était laissé sans injection ni électrotransfert (ET) avant induction du trauma, et un autre groupe était laissé naïf. Le trauma était réalisé huit jours après les traitements. Les mesures étaient réalisées sur une carotte de cerveau, par dosage ELISA. (moyenne + SEM, n=11 à 13, sauf groupe naïf n=20). # : p< 0,005 versus NaCl ; ## : p<0,0005 versus NaCl (Mann-Whitney).

Le traumatisme crânien induisait un taux circulant de TNF-α élevé 24 heures après le traumatisme, en accord avec la cinétique de TNF-α précédemment effectuée. Ce taux de TNF-α élevé indique l'existence d'une inflammation systémique en parallèle à l'inflammation intracérébrale due au traumatisme. Les animaux contrôles non injectés ou électrotransférés par la solution saline n'avaient pas un taux de TNF-α sérique différent. La procédure d'électrotransfert n'induit donc pas une inflammation systémique détectable neuf jours après électrotransfert. Cette production de TNF-α était inhibée par les variants de hTNFR-Is produits par le muscle électrotransféré (inhibition significative pour les formes protéine de fusion et dimère). Les trois constructions étaient efficaces et permettaient une inhibition comparable du TNF-α circulant, même si leur stabilité et taux de production différaient.

III.1.3-c) Scores neurologiques

Le score neurologique était évalué 3 heures et 24 heures après le traumatisme. Deux mesures sont effectuées : le string et le grip ; elles permettent d'évaluer les fonctions motrices de l'animal[96]. L'évaluation de ce paramètre est indispensable dans la mesure où le modèle est diffus, et ne permet donc pas de définir un "volume de lésion".

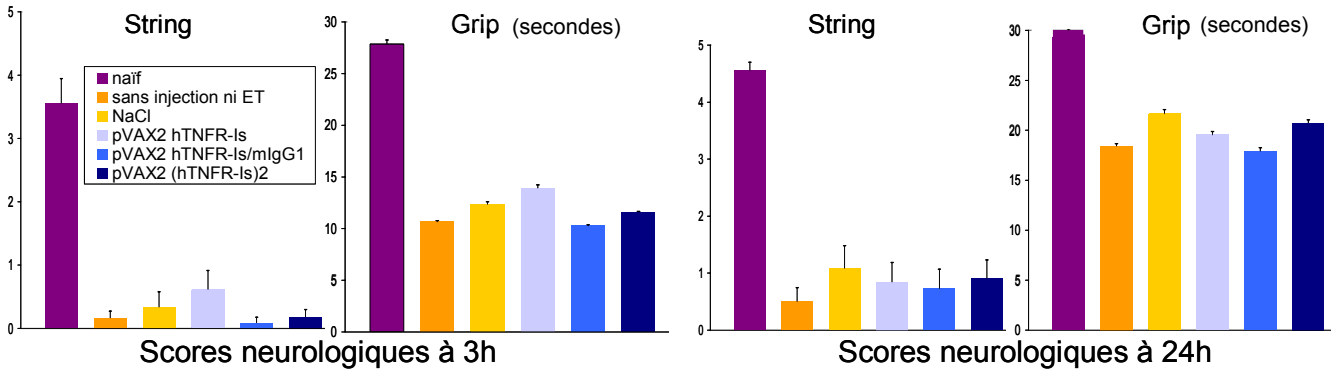


Figure 38 : Scores neurologiques (string et grip) 3 heures et 24 heures après induction du traumatisme crânien. Les souris étaient traitées par injection et électrotransfert de plasmide pVAX2 hTNFR-Is, pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, pVAX2 (hTNFR-Is)2, ou NaCl. Un groupe contrôle était laissé sans injection ni électrotransfert (ET) avant induction du trauma, et un autre groupe était laissé naïf. Le trauma était réalisé huit jours après les traitements. (moyenne + SEM, n=11 à 13, sauf groupe naïf n=20).

Les tests effectués montrent qu'il n'y a aucun effet bénéfique visible du traitement par électrotransfert de plasmide hTNFR-Is, ni à 3 heures ni à 24 heures, sur les deux paramètres de motricité évalués.
La comparaison des scores des animaux contrôles non injectés ou électrotransférés par la solution saline montre que la réalisation d'un électrotransfert n'induit pas de déficit moteur notable neuf jours plus tard.

Cette première série d'expériences nous a permis de tirer plusieurs conclusions importantes.
Les traitements anti-TNF effectués ne permettent pas d'obtenir un effet clinique bénéfique sur les capacités motrices des animaux dans les 24 heures suivant le traumatisme.
La forme protéine de fusion est détectée dans le cerveau, dans les deux zones étudiées ; elle est donc capable de franchir la BHE suite au traumatisme crânien, et comme cette forme est bien plus stable que les deux autres dans la circulation, elle est retrouvée à des taux supérieurs dans le cerveau. Les taux de TNF-α local mettent en évidence le phénomène inflammatoire local dû au trauma, dans la zone de choc mais aussi dans la zone de contrecoup. Les taux de TNF-α sont partiellement inhibés par les traitements anti-TNF, avec une efficacité assez identique pour les trois formes, malgré des taux de hTNFR-Is détectés différents.
Le TNF-α est aussi détecté dans la circulation à des taux assez élevés. La demi-vie du TNF-α étant inférieure à une heure et l'ouverture de BHE ne dépassant pas 6 heures après l'induction du traumatisme, la détection à 24 heures de TNF-α dans la circulation est liée à une production systémique de TNF-α.
La production de hTNFR-Is obtenue permet l'inhibition partielle du TNF-α local et systémique. Cependant, cette inhibition est insuffisante pour obtenir un effet clinique visible.

III.1.4 ***Etude approfondie de la forme chimérique hTNFR-Is/mIgG1***

Suite à cette première série d'expériences, nous souhaitions savoir si les protéines détectées dans les carottes de cerveau se trouvaient dans la microvasculature du cerveau, ou dans le parenchyme cérébral. Pour cela, nous avons perfusé les souris avant les prélèvements, afin d'éliminer la composante vasculaire dans ces échantillons.
La forme fusionnée hTNFR-Is/mIgG1 a été détectée dans le cerveau ; elle est donc capable de passer la BHE suite au trauma. Comme cette forme est plus stable dans la circulation et se lie efficacement au TNF-α, nous avons étudié uniquement ce variant dans cette seconde série d'expériences.
Nous n'avions, par ailleurs, pas obtenu de résultats concluants sur les paramètres cliniques d'évaluation de la récupération des fonctions motrices suite au traumatisme. Ces évaluations ne sont

pas assez sensibles pour nous permettre d'observer un éventuel effet bénéfique du traitement par anti-TNF. Nous avons donc décidé d'évaluer d'autres paramètres dans cette seconde série d'expériences : masse, température, œdème cérébral.
En effet, le déficit neurologique s'accompagne d'une phase d'hypothermie modérée (1-2°C), associée à une perte pondérale de près de 20% un jour après le trauma. Une hypothermie modérée est connue comme étant protectrice, en réduisant la mortalité et en contribuant à l'amélioration du devenir des traumatisés crâniens[87]. Le TNF-α exerce quant à lui un effet pyrogène. Ainsi, l'inhibition du TNF-α à l'aide de récepteurs solubles pourrait conduire à un effet protecteur, en favorisant l'hypothermie des animaux.
La perte de masse contribue quant à elle à augmenter le taux de mortalité. En effet le trauma induit un dérèglement hormonal intense durant la phase aiguë du trauma qui instaure un état d'hypermétabolisme. De même, le TNF-α exerce un effet anorexigène[383] ; son inhibition par l'utilisation de récepteurs solubles du TNF-α pourrait être bénéfique en limitant la perte de masse des animaux.

Les groupes réalisés sont les suivants (n=40, avant induction du traumatisme, sauf naïf : n=20) :
- Naïf : sans injection ni électrotransfert ni trauma
- Sans injection ni électrotransfert + trauma
- Électrotransfert de 2*30µl de NaCl 150mM + trauma
- Électrotransfert de 2*25 µg de pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 + trauma

Les souris étaient traitées huit jours avant l'induction du traumatisme crânien.

Les scores neurologiques (string et grip) ont été réalisés 3 et 24 heures après le traumatisme. Comme attendu d'après les résultats de la première série d'expérience, aucun effet bénéfique n'a été observé chez les souris traitées par électrotransfert de plasmide codant la protéine de fusion hTNFR-Is/mIgG1. Les taux local et systémique de protéine de fusion ont été contrôlés, et sont en accord avec ceux attendus pour un traitement avec 2*25µg de plasmide.

Aucun effet hypothermique n'a été observé par le traitement anti-TNF, comparé aux deux groupes traumatisés contrôles (sans injection ni électrotransfert ou électrotransfert de solution saline).

III.1.4-a) Evolution de la masse corporelle

Nous avons suivi l'évolution de la masse corporelle des souris avant le trauma, puis 3 heures et 24 heures après le trauma. Les souris naïves prenaient en moyenne 1 gramme par jour.

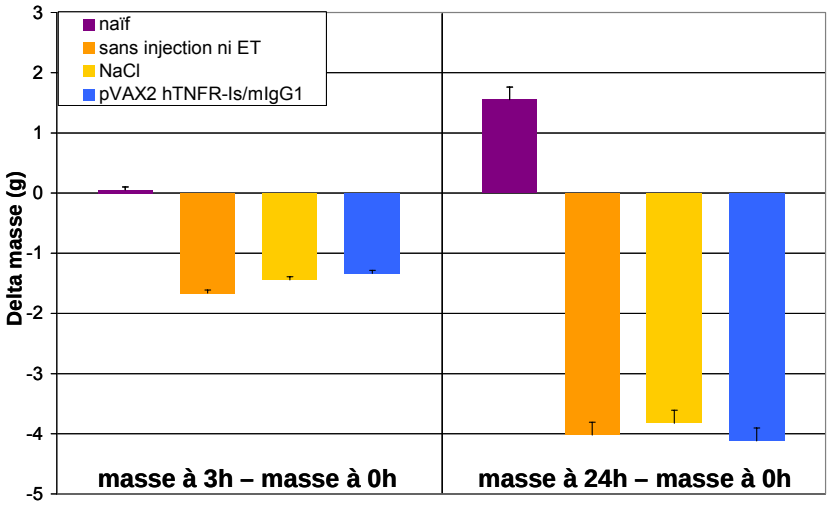


Figure 39 : Evolution de la masse corporelle des souris par rapport à leur masse juste avant induction du traumatisme. Les souris sont pesées 3 et 24 heures après le trauma. Les souris étaient traitées par injection et électrotransfert de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 ou NaCl. Un groupe contrôle était laissé sans injection ni électrotransfert (ET) avant induction du trauma, et un autre groupe était laissé naïf. Le trauma était réalisé huit jours après les traitements. (moyenne + SEM, n=22 à 25, sauf groupe naïf n=20).

Comme attendu, les souris non traumatisées prennent en moyenne 1,5 grammes en 24 heures. Par contre, le trauma induisait une perte de masse, d'environ 1,5 g à 3 heures et 4 grammes à 24 heures chez les souris traumatisées contrôles (sans injection ni électrotransfert ou électrotransfert de solution saline). Malgré l'effet anorexigène du TNF-α, le traitement réalisé à l'aide du plasmide codant la protéine hTNFR-Is/mIgG1 ne permettait pas d'empêcher la perte de masse des souris dans les 24 heures suivant le trauma.

III.1.4-b) Œdème cérébral

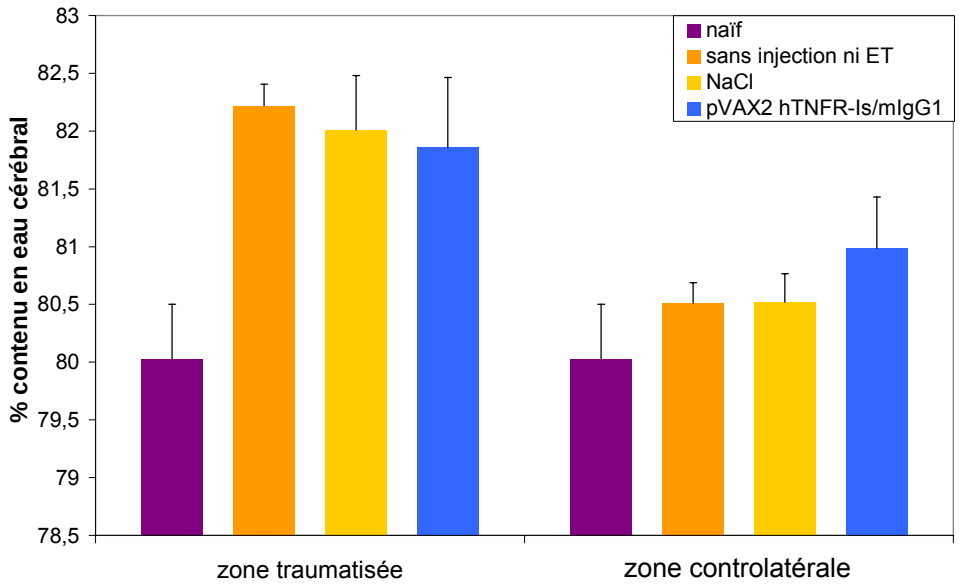


Figure 40 : Evaluation de l'œdème cérébral 24 heures après le trauma. Les souris étaient traitées par injection et électrotransfert de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 ou NaCl. Un groupe contrôle était laissé sans injection ni électrotransfert (ET) avant induction du trauma, et un autre groupe était laissé naïf. Le trauma était réalisé huit jours après les traitements. L'œdème était évalué par quantification du contenu en eau dans une carotte de cerveau située au niveau de la zone traumatisée ou de la zone controlatérale. (moyenne + SEM, n=15, sauf groupe naïf n=20).

Ce modèle de trauma cérébral induit la formation d'un œdème cérébral entre 1 heure et 15 jours après induction du traumatisme[381]. Comparé aux souris naïves dont le contenu en eau était d'environ 80%, le cerveau des souris traumatisées avait un contenu en eau d'environ 82% dans la région traumatisée, et 80,5% dans la région controlatérale. Le prétraitement par électrotransfert du plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 ne permettait pas d'inhiber la formation de l'œdème cérébral dans ces deux régions.

III.1.4-c) Détection de hTNFR-Is local

Les résultats de la première série d'expériences montrent que la protéine de fusion est retrouvée dans le cerveau 24 heures après induction du traumatisme crânien. Cependant, nous souhaitions savoir si la protéine thérapeutique reste dans la microvasculature cérébrale ou est véritablement dans le parenchyme cérébral.
Dans ce but, 5 animaux par groupe ont été perfusés avec 100 mL de PBS.

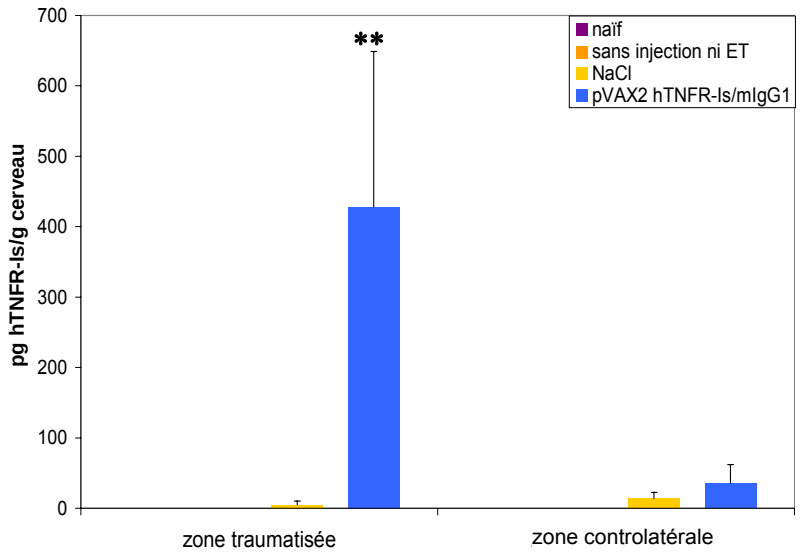


Figure 41 : Taux de hTNFR-Is dans la zone du traumatisme crânien ou la zone controlatérale 24 heures après le trauma. Les souris étaient traitées par injection et électrotransfert de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 ou NaCl. Un groupe contrôle était laissé sans injection ni électrotransfert (ET) avant induction du trauma, et un autre groupe était laissé naïf. Le trauma était réalisé huit jours après les traitements. Les animaux utilisés pour ces mesures étaient perfusés avec 100mL de PBS afin d'éliminer la composante vasculaire. Les mesures étaient réalisées sur une carotte de cerveau, par dosage ELISA. (moyenne + SEM, n=5). ** *: p<0,01 versus NaCl (Mann-Whitney).*

Les taux de hTNFR-Is détectés étaient nettement inférieurs à ceux obtenus dans la première série d'expériences, sans perfusion des animaux (environ 30 fois moins pour la zone du traumatisme, et 500 fois moins pour la zone controlatérale). La grande majorité du hTNFR-Is est donc circulante. Cependant, dans la région traumatisée, la quantité de hTNFR-Is était non négligeable ; le hTNFR-Is était donc capable, localement, de "sortir" de la circulation pour aller dans le tissu cérébral.

III.1.4-d) Taux de TNF-α local

Au cours de la première série d'expérience, nous avions réussi à mettre en évidence une inflammation locale importante 24 heures après induction du traumatisme crânien, celle-ci étant diminuée par les traitements anti-TNF utilisés. Nous souhaitions vérifier si cette inhibition locale était retrouvée véritablement dans le parenchyme cérébral. Dans ce but, 5 animaux par groupe ont été perfusés avec 100 mL de PBS.

Les taux de TNF-α détectés (Figure 42) étaient là aussi inférieurs à ceux obtenus lors de la première série d'expériences, sans perfusion des animaux (10 fois et 16 fois plus faibles dans la région du traumatisme et controlatérale, respectivement). Ayant éliminé la composante vasculaire, nous obtenons désormais des taux identiques dans la zone traumatisée et controlatérale (le TNF-α n'est plus "bloqué" dans la région controlatérale). Dans les deux zones étudiées, la protéine de fusion permettait d'inhiber environ 60% du TNF-α situé dans le tissu cérébral.

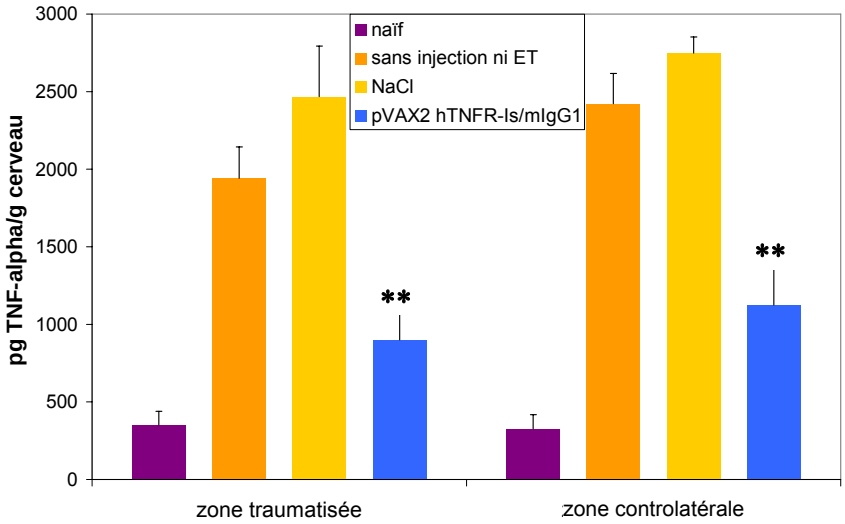


*Figure 42 : Taux de TNF-α dans la zone du traumatisme crânien ou la zone controlatérale 24 heures après le trauma. Les souris étaient traitées par injection et électrotransfert de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 ou NaCl. Un groupe contrôle était laissé sans injection ni électrotransfert (ET) avant induction du trauma, et un autre groupe était laissé naïf. Le trauma était réalisé huit jours après les traitements. Les animaux utilisés pour ces mesures étaient perfusés avec 100mL de PBS afin d'éliminer la composante vasculaire. Les mesures étaient réalisées sur une carotte de cerveau, par dosage ELISA. (moyenne + SEM, n=5). **: p<0,01 versus NaCl (Mann-Whitney).*

La protéine transgénique hTNFR-Is/mIgG1 est donc capable de passer la BHE après induction du traumatisme crânien, et de quitter la circulation pour atteindre les zones inflammatoires locales. Cependant, les paramètres étudiés (score neurologique, œdème cérébral, masse pondérale, température rectale) ne sont pas assez sensibles pour mettre en évidence un possible effet bénéfique du traitement par anti-TNF dans ce modèle de traumatisme. Nous souhaitons désormais réaliser des études de RT-PCR en temps réel, qui vont nous permettre une mesure beaucoup plus fine des paramètres modifiés par cette approche, et donc d'estimer si cette voie peut présenter un intérêt thérapeutique.

III.2. Uvéite expérimentale aux endotoxines

Nous avons souhaité évaluer la potentialité d'un traitement par électrotransfert dans le muscle ciliaire à l'aide du plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 dans un modèle d'uvéite chez le rat, l'uvéite expérimentale aux endotoxines (EIU).

III.2.1 *Electrotransfert de 30 µg de plasmide codant la forme chimérique*

La première expérience a été réalisée avec injection d'une forte dose de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (30 µg), avec ou sans électrotransfert, et un groupe contrôle naïf (n=14, les deux yeux recevaient le même traitement). Une uvéite expérimentale était induite six jours après électrotransfert, lorsque les taux de hTNFR-Is produits étaient assez élevés. Les humeurs aqueuses (HA, pour dosage, 8/groupe), les globes oculaires (pour cryosections, 6/groupe), et le sérum étaient prélevés sept jours après les injections de plasmide.

III.2.1-a) Détection de hTNFR-Is local et systémique

Le tableau récapitule les résultats des dosages hTNFR-Is dans l'humeur aqueuse selon les différents traitements ; nous y avons replacé les valeurs obtenues avec la même dose de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 chez des animaux sains (n=6).

Traitement	Electrotransfert	EIU	hTNFR-Is pg/mL
/	-	-	non détectable
pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (30µg)	-	-	274 ± 39
pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (30µg)	+	-	691 ± 121 *
HA controlatérale de l'œil ET (sans injection)	-	-	15 ± 11
/	-	+	non détectable
pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (30µg)	-	+	181 ± 108
pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (30µg)	+	+	1070 ± 218 #

*Tableau 7 : Taux de hTNFR-Is dans l'humeur aqueuse (HA) de rats 7 jours après injection et électrotransfert de pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, après induction ou non d'une uvéite expérimentale au LPS au sixième jour. Les prélèvements étaient effectués 24h après induction de la maladie. (moyenne ± SEM, n=6 HA pour l'expérience sans uvéite, n=8 pour l'expérience dans le modèle d'uvéite ; les HA ont été rassemblées par 2 pour les dosages). * : p<0,02 versus pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 sans électrotransfert ; # : p<0,01 versus pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 sans électrotransfert (Mann-Whitney).*

Le sérum des animaux était prélevé et dosé, mais aucun hTNFR-Is n'a été détecté.
L'induction d'une uvéite expérimentale ne modifiait pas significativement les taux de hTNFR-Is détectés, qui étaient un peu plus élevés chez les animaux malades traités par électrotransfert, et le hTNFR-Is n'était pas détecté chez les animaux contrôles qui ont une uvéite. Le dosage utilisé était donc bien spécifique du récepteur soluble de type I du TNF-α humain, et ne permettait pas la détection du récepteur soluble endogène. La procédure d'électrotransfert utilisée permettait donc une production efficace de hTNFR-Is dans l'humeur aqueuse.

III.2.1-b) Résultats cliniques

L'analyse clinique des animaux chez lesquels une uvéite expérimentale a été induite mettait en évidence une très nette protection des anti-TNF. Comparés au groupe contrôle sans traitement (score clinique de 4,8), les rats traités par injection seule de 30 µg de pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 avaient un score clinique réduit à 2,0. Le traitement par électrotransfert réduisait quant à lui très significativement les scores cliniques à 0,4.

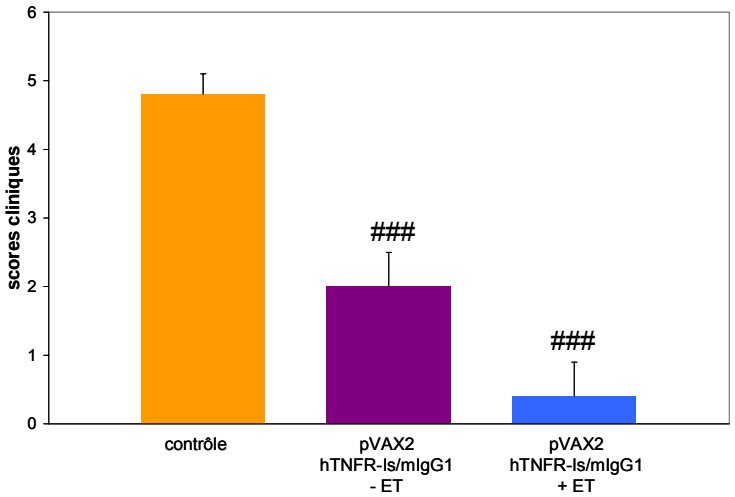


Figure 43 : Effets cliniques du traitement par le plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (30µg) par injection seule dans le muscle ciliaire ou injection suivie d'un électrotransfert dans le modèle d'uvéite expérimentale au LPS, induite six jours après les injections de plasmide. L'analyse clinique est réalisée 24 heures après induction au LPS. (moyenne + SEM, n=14). ### : p<0,0001 versus contrôle (Mann-Withney).

III.2.1-c) Analyse histologique

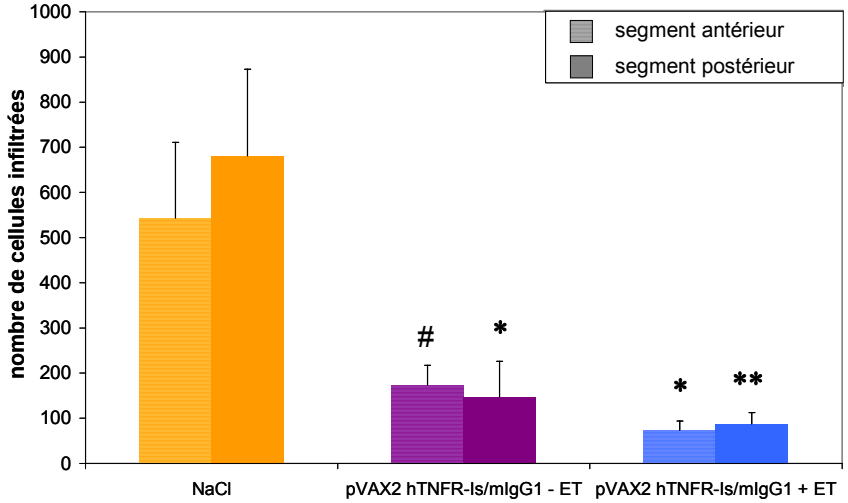


*Figure 44 : Effet sur les paramètres histologiques du traitement par le plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (30µg) dans l'uvéite expérimentale au LPS. (moyenne + SEM, n=6). # : p<0,005 versus contrôle ; * : p<0,002 versus contrôle ; ** : p<0,001 versus NaCl (Mann-Withney).*

En accord avec les résultats cliniques, l'analyse histologique montrait un effet protecteur efficace de l'injection seule de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, et encore plus important par électrotransfert de ce même plasmide. Cette inhibition était observée dans le segment antérieur et le segment postérieur de l'œil.

III.2.2 *Electrotransfert de 3 µg de plasmide codant la forme chimérique*

Les résultats obtenus sont très convaincants, mais la dose de plasmide est élevée compte tenu de la taille du compartiment oculaire. Nous avons donc voulu tester une dose dix fois inférieure de plasmide, 3µg, dans le même modèle. Ceci permettrait de s'affranchir vraiment de tous les effets indésirables potentiels liés à l'administration d'un plasmide en grande quantité, et aussi à la production d'un anti-TNF à taux élevé.

A cette dose, les taux de hTNFR-Is sécrétés dans l'humeur aqueuse étaient difficilement quantifiables par dosage ELISA. Nous avons donc évalué la production de hTNFR-Is indirectement, par l'inhibition de détection du TNF-α local qui en résulte, ce dernier n'étant pas détecté par notre dosage lorsqu'il est lié à un récepteur soluble.
Les différents groupes expérimentaux étudiés étaient (n=8, les animaux recevaient le même traitement dans les 2 yeux) :

- Sans injection ni électrotransfert
- Injection de NaCl 150mM avec électrotransfert
- 3 µg de plasmide contrôle pVAX2 avec électrotransfert
- 3 µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 sans électrotransfert
- 3 µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 avec électrotransfert

Un groupe de rats était laissé naïfs.

III.2.2-a) Inhibition du TNF-α local

Le taux de TNF-α était en dessous du seuil de détection chez les animaux naïfs, et était assez élevé (509 pg/mL) chez les animaux atteints d'uvéite. Ce taux local de TNF-α n'était pas différent chez les animaux traités par électrotransfert de solution saline (374 pg/mL) ou de 3µg de plasmide contrôle (479 pg/mL). Le traitement par injection seule du plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 à la dose de 3µg permettait une diminution du taux de TNF-α. Cette baisse n'était statistiquement significative que par rapport au groupe traité par injection et électrotransfert de plasmide vide. Le groupe d'animaux traités par injection et électrotransfert du plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 présentait une baisse significative ($p<0,02$ *versus* NaCl et $p<0,05$ *versus* pVAX2) du taux de TNF-α dans l'humeur aqueuse (127 pg/mL). Ceci illustre l'intérêt des anti-TNF dans la pathologie, et surtout l'efficacité de l'électrotransfert dans le muscle ciliaire comparé à l'administration seule d'ADN.

Traitement	Electrotransfert	EIU	TNF-aplha pg/mL
/	-	-	non détectable
/	-	+	509 ± 44
NaCl	+	+	374 ± 65
pVAX2 (3µg)	+	+	479 ± 33
pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (3µg)	-	+	250 ± 45 #
pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (3µg)	+	+	127 ± 16 * #

*Tableau 8 : Taux de TNF-α de rat dans l'humeur aqueuse de rats, après induction d'une uvéite expérimentale au LPS. Les prélèvements étaient effectués 24h après induction de la maladie. (moyenne ± SEM, n=8). * : $p<0,02$ versus NaCl ; # : $p<0,05$ versus pVAX2 (Mann-Withney).*

III.2.2-b) Résultats cliniques

Les scores cliniques étaient évalués 24 heures après induction de l'uvéite expérimentale au LPS, par des ophtalmologistes en lecture aveugle.
Les animaux contrôles avaient un score moyen de 3,8. Les animaux traités par électrotransfert de solution saline avaient un score moyen de 3,9 et ceux traités par électrotransfert de plasmide vide avaient un score moyen de 3,8 ; ces deux traitements n'étaient donc pas différents des contrôles. Le traitement à l'aide du plasmide thérapeutique pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 par injection seule ne permettait pas de réduire les signes cliniques de la maladie (3,7). Par contre la même dose de ce plasmide injecté et électrotransféré dans le muscle ciliaire permettait une réduction significative des signes cliniques de l'uvéite par rapport à l'injection seule du même plasmide (1,2 ; $p<0,0002$ *versus*

pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 – ET) ou par rapport aux groupes contrôles (p<0,0003 *versus* NaCl + ET, p<0,0001 *versus* contrôle ou pVAX2 + ET).

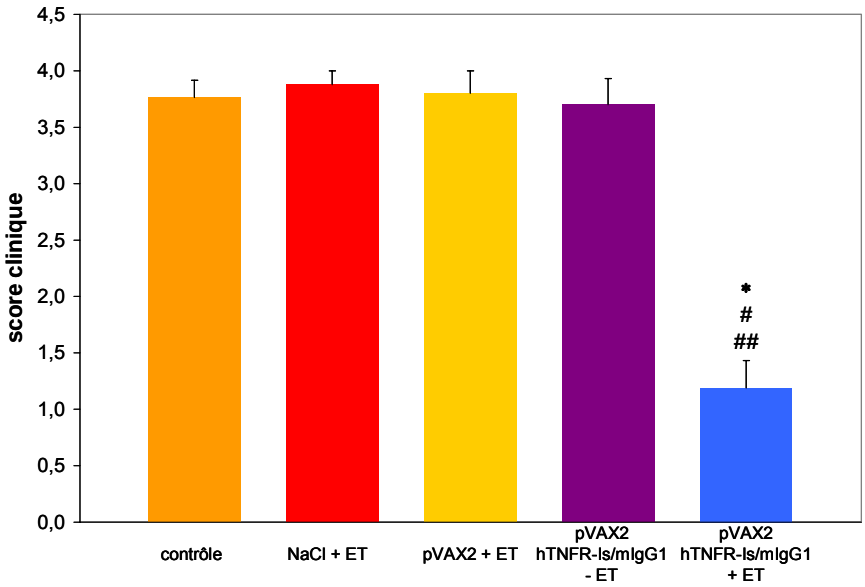


*Figure 45 : Effets cliniques du traitement par le plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (3µg) par injection seule dans le muscle ciliaire ou injection suivie d'un électrotransfert (ET) dans le modèle d'uvéite expérimentale au LPS. L'analyse clinique était réalisée 24 heures après induction au LPS. (moyenne ± SEM, n=16, sauf NaCl et pVAX2 : n=8).). * : p<0,0002 versus pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 – ET ; # : p<0,0003 versus NaCl + ET ; ## : p<0,0001 versus contrôle ou pVAX2 + ET (Mann-Withney).*

III.2.2-c) Analyse histologique

L'analyse histologique réalisée permettait de quantifier le nombre de cellules infiltrées dans les segments antérieurs (iris, corps ciliaire et chambre antérieure) et postérieur (rétine, nerf optique, vitré). Comparés aux animaux contrôles sans traitement, ni l'électrotransfert du plasmide contrôle, ni l'injection seule du plasmide thérapeutique ne permettaient de réduire l'infiltration cellulaire. Par contre, l'électrotransfert de 3µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 permettait une diminution très nette de l'infiltration cellulaire dans les deux segments étudiés.

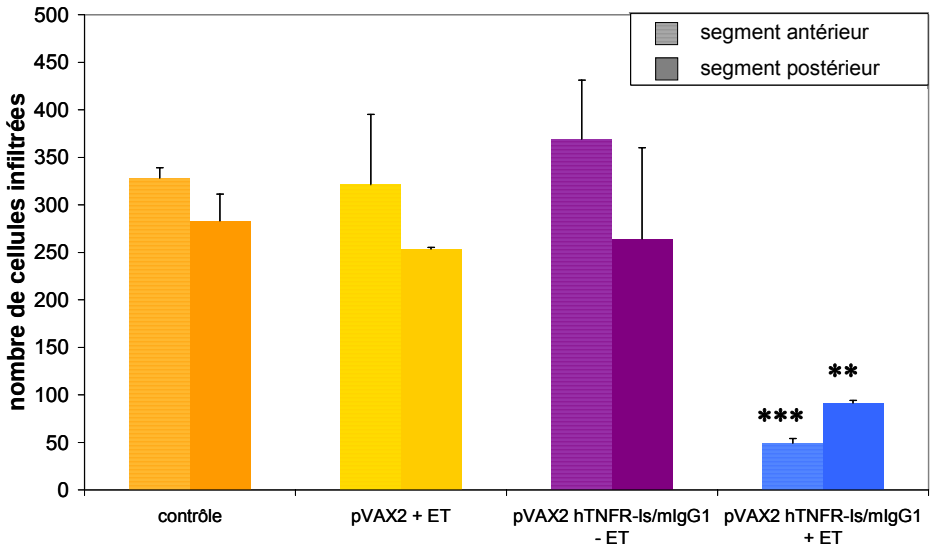


*Figure 46 : Effet sur les paramètres histologiques du traitement par le plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (3µg) dans l'uvéite expérimentale au LPS. (moyenne + SEM, n=8). ** : p<0,01 versus pVAX2 ou NaCl ; *** : p<0,001 versus pVAX2 ou NaCl (Mann-Withney).*

III.3. Arthrite expérimentale au collagène : approche systémique

Nous avons souhaité évaluer l'efficacité des variants des récepteurs solubles du TNF-α dans un modèle animal de polyarthrite rhumatoïde, l'arthrite expérimentale au collagène. L'efficacité thérapeutique a été évaluée par électrotransfert intramusculaire.

III.3.1 *Electrotransfert de 15 µg de plasmide codant les variants du hTNFR-Is*

Une première expérience a été réalisée par injection et électrotransfert de 15 µg de plasmide pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2, pCOR Vide ou NaCl, ou encore injection seule de pCOR hTNFR-Is/mIgG1 (n=8 sauf pCOR Vide et NaCl : n=10) à l'apparition des signes cliniques de la maladie (27 jours après immunisation).

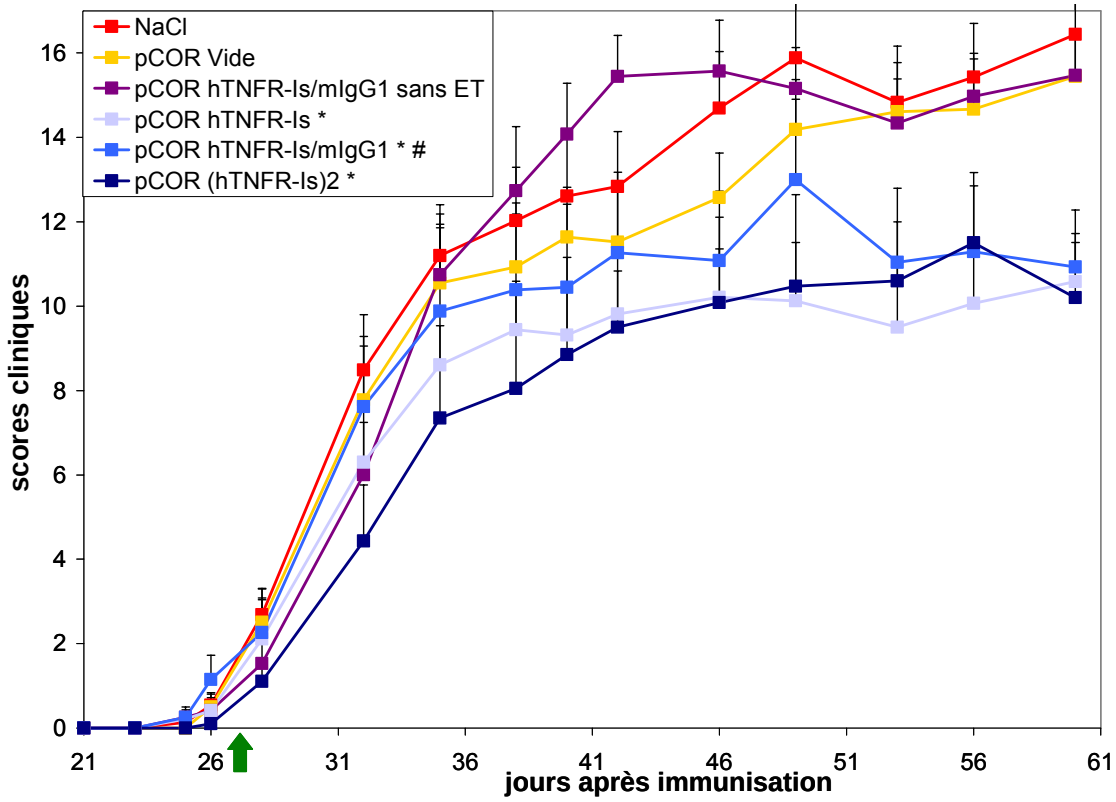


Figure 47 : Effets cliniques de l'électrotransfert de 15µg de plasmide codant des variants du hTNFR-Is dans le modèle d'arthrite expérimentale au collagène. Le traitement par électrotransfert (ET) ou l'injection seule était administré à l'apparition des signes cliniques de la maladie (27 jours après immunisation, flèche verte) dans le muscle tibial cranial d'une patte (15µg). Deux groupes contrôles étaient réalisés, soit par électrotransfert de 15µg de plasmide Vide, soit par électrotransfert de 30µl de NaCl. Les scores cliniques ont été évalués dans les quatre pattes. Chaque point représente le score clinique moyen du groupe correspondant (moyenne + SEM, n=8, sauf pCOR Vide : n=10 et NaCl : n=10) ✱ *: p<0,02 versus pCOR Vide ou NaCl ; # : p<0,02 versus pCOR hTNFR-Is/mIgG1 sans ET (Anova).*

Le suivi clinique nous a permis de valider l'intérêt de l'électrotransfert puisque le groupe d'animaux traités par injection seule du plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1 n'était pas du tout protégé de la maladie et présentait des scores cliniques similaires au groupe contrôle traité par le plasmide Vide.

Dans cette expérience, l'électrotransfert de plasmide codant les variants du hTNR-Is permettait une inhibition modérée des signes cliniques de la maladie tout au long de son suivi. Cette inhibition était statistiquement significative pour les trois traitements ($p<0,02$ *versus* pCOR Vide ou NaCl, Anova). L'évolution des signes cliniques de la maladie des souris traitées par le plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1 était statistiquement différente entre le groupe traité par injection seule, et le groupe traité par électrotransfert ($p<0,02$, Anova).

III.3.2 *Electrotransfert de 50 µg de plasmide codant les variants du hTNFR-Is*

Afin d'observer un effet thérapeutique plus net, et la différence éventuelle d'efficacité des variants étudiés, nous avons effectué une nouvelle série d'expériences avec injection et électrotransfert de 25 µg par patte de plasmide pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2, pCOR Vide, ou NaCl, à l'apparition des signes cliniques de la maladie, soit 25 jours après immunisation. Un groupe contrôle positif de la possibilité de traiter efficacement les souris dans ce modèle à l'aide d'anti-TNF a été réalisé par injection intrapéritonéale trois fois par semaine de 200 µg d'etanercept. Cette dose a au préalable prouvé son efficacité dans le modèle[368,384]. A partir du 42ème jour après immunisation, nous avons espacé les injections de protéine recombinante à deux par semaine, puis nous avons stoppé les injections au jour 53.

III.3.2-a) Résultats cliniques

Les résultats du suivi clinique des animaux sont représentés sur la figure 48.
Les scores cliniques des souris traitées par électrotransfert de plasmide Vide ou de NaCl avaient une évolution légèrement différente. Ceci peut résulter d'une stimulation immune liée à la quantité assez élevée de plasmide utilisé.
Seul le traitement par électrotransfert de plasmide codant la protéine de fusion permettait une baisse très nette des signes cliniques de la maladie ($p=0,0001$ *versus* NaCl ou pCOR Vide). Cependant, les souris traitées par électrotransfert de plasmide codant la forme dimérique du hTNFR-Is montraient une inhibition modérée des signes cliniques de la maladie ($p<0,05$ *versus* pCOR Vide). Nous avons observé une stabilisation des signes cliniques de la maladie dans le groupe traité par électrotransfert de plasmide codant la protéine de fusion environ dix jours après le traitement, ce qui correspondait au délai nécessaire pour obtenir un taux sérique suffisant de protéine thérapeutique.
Les souris traitées par injections répétées d'etanercept étaient bien protégées de la maladie jusqu'au jour 42. Lorsque les injections étaient espacées, les signes cliniques de la maladie commençaient à augmenter, et lorsqu'il n'y avait pas d'injection pendant une semaine entière, les signes cliniques de la maladie se développaient fortement, le score moyen de ces souris devenant supérieur à celui des souris traitées par un unique électrotransfert de plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1 à l'apparition des signes cliniques de la maladie.

III.3.2-b) Analyse histologique

L'analyse histologique de cette expérience (Figure 49 et tableau 9) mettait en évidence une différence très nette entre les souris traitées par électrotransfert de plasmide codant la protéine de fusion et les groupes contrôles ($p<0,05$ *versus* NaCl et pCOR Vide). Comme attendu, le traitement par etanercept permettait une protection efficace contre l'inflammation et la destruction articulaire ($p<0,02$ *versus* NaCl et pCOR Vide). Aucune différence n'a été observée entre les groupes traités par électrotransfert de plasmide codant les formes monomérique ou dimérique et les groupes contrôles.

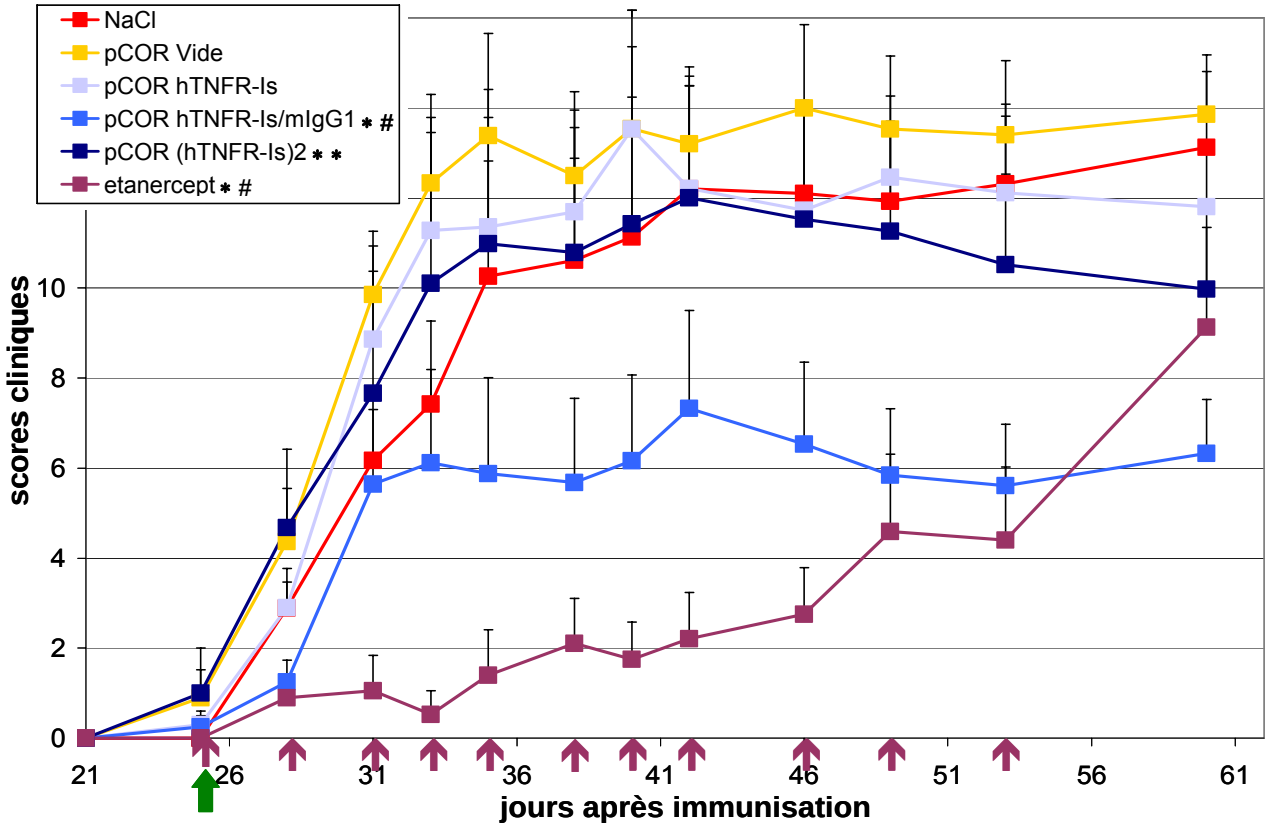


*Figure 48 : Effets cliniques de l'électrotransfert de 50µg de plasmide codant des variants du hTNFR-Is et de l'injection d'etanercept (TNFR-IIs/Fc) dans le modèle d'arthrite expérimentale au collagène. Le traitement par électrotransfert était administré à l'apparition des signes cliniques de la maladie (25 jours après immunisation, flèche verte) dans le muscle tibial cranial des deux pattes (2*25µg). Un groupe de souris était traité par injection intrapéritonéale de 200µg d'etanercept aux dates indiquées par les flèches violettes. Deux groupes contrôles ont été réalisés, soit par électrotransfert de 2*25µg de plasmide Vide, soit par électrotransfert de 2*30µl de NaCl. Les scores cliniques ont été évalués dans les quatre pattes. Chaque point représente le score clinique moyen du groupe correspondant (moyenne + SEM, n=10, sauf pCOR Vide : n=15 et NaCl : n=14) * : p<0,0001 versus pCOR Vide ; ** : p<0,05 versus pCOR Vide ; # : p<0,0001 versus NaCl (Anova).*

Plasmide électrotransféré	**Score des pattes postérieures**
NaCl	1.87 ± 0.29
pCOR Vide	1.77 ± 0.23
pCOR hTNFR-Is	1.72 ± 0.37
pCOR hTNFR-Is/mIgG1	0.94 ± 0.32 *
pCOR (hTNFR-Is)2	1.71 ± 0.35
etanercept	0.75 ± 0.30 **

*Tableau 9 : Effet des variants du hTNFR-Is sur les paramètres histologiques dans l'arthrite expérimentale au collagène. 25 µg de plasmide ou 30µl de NaCl était injectés et électrotransférés dans chacun des muscles tibiaux craniaux de la souris. Le traitement était administré à l'apparition des signes cliniques de la maladie (25 jours après immunisation). (moyenne ± SEM). * : p<0,05 versus pCOR Vide ou NaCl ; ** : p<0,02 versus pCOR Vide ou NaCl.*

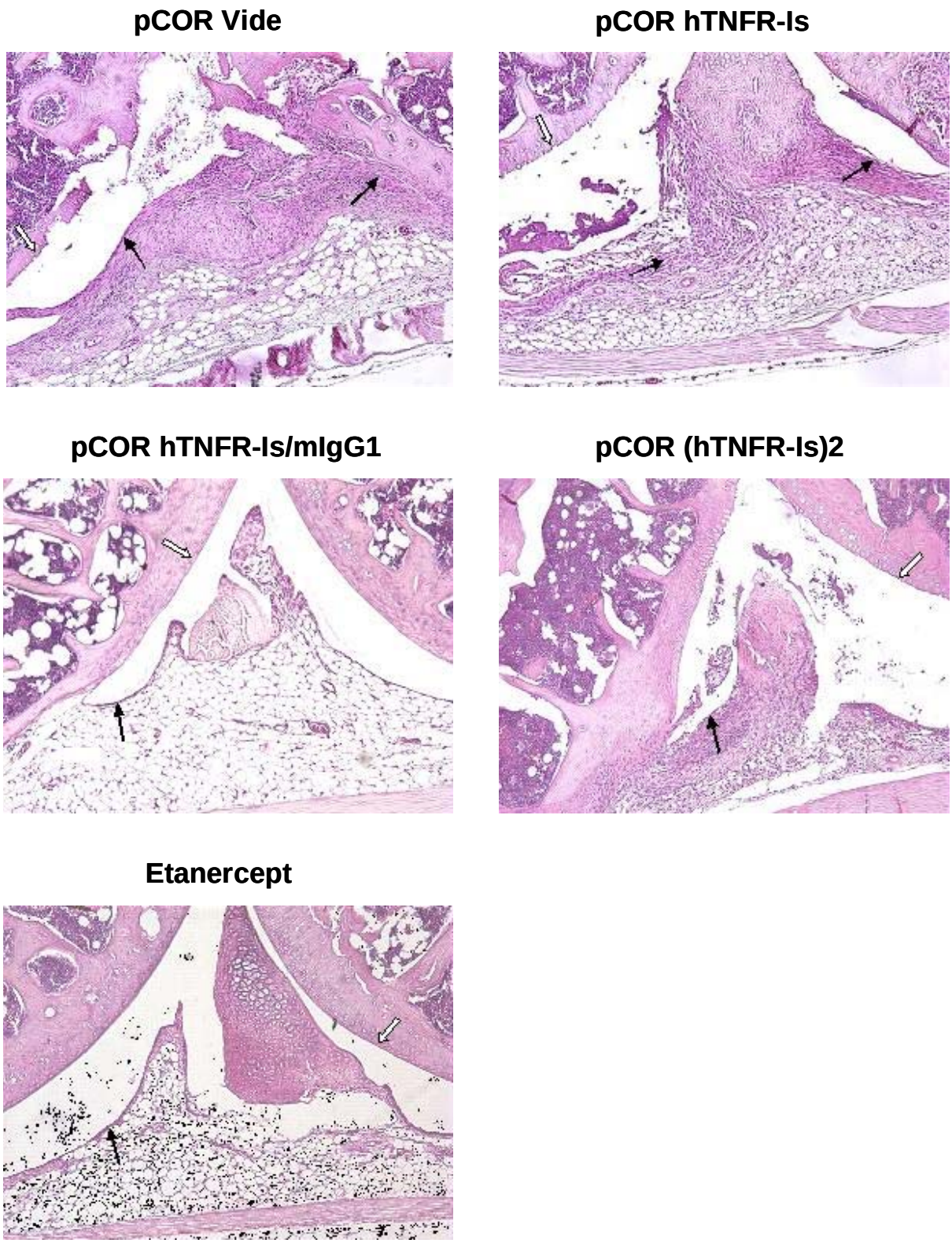


Figure 49 : Exemples illustrant l'analyse histologique (coloration hémalun-éosine, grossissement X100). Photos représentant le genou (flèche noire : membrane synoviale, flèche blanche : cartilage). Traitements par pCOR Vide, pCOR hTNFR-Is, et pCOR (hTNFR-Is)2 : synovite et destruction du cartilage. Traitements par pCOR hTNFR-Is et Etanercept : aspect normal de la membrane synoviale et du cartilage.

Une étude par électrotransfert intra-articulaire des variants du hTNFR-Is dans le modèle d'arthrite expérimentale au collagène devrait être réalisée prochainement.

IV. Transfert de gène par cellules autologues

Parallèlement aux approches développées par électrotransfert, nous avons établi une lignée stable de fibroblastes autologues DBA/Tst exprimant constitutivement la protéine chimérique hTNFR-Is/mIgG1. Nous souhaitions ainsi développer une approche systémique alternative à l'électrotransfert intramusculaire pour le traitement de l'arthrite expérimentale au collagène, et comparer ces deux approches.

IV.1. Validation de l'approche par thérapie génique cellulaire

La lignée stable DBA/Tst/hTNR-Is/mIgG1 a été établie par transfection stable des cellules DBA/Tst avec le plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1. Après deux mois de sélection par l'hygromycine, deux clones ont été sélectionnés.

IV.1.1 *Expression de hTNFR-Is par les cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 in vitro*

Afin de déterminer la production de TNFR-Is par les deux clones sélectionnés, 3.10^5, 5.10^5 ou 7.10^5 cellules de chaque clone étaient ensemencées dans 3 mL de milieu complet dans des plaques de culture 6 puits, et étaient mises en incubation à 37°C pendant 24 heures. Un dosage ELISA des surnageants de culture était alors effectué. Les clones sélectionnés produisaient 53 et 73 ng/10^6 cellules/24 heures.
Ces clones ont donc une production de TNFR-Is assez élevée comparée aux clones de la lignée stable DBA/Tst/mIL-4 déjà établie au laboratoire, qui produisent 3 ng d'IL-4/10^6 cellules/24 heures[366].
Dans la suite des expériences, le clone ayant la production de TNFR-Is la plus élevée a été utilisé.

IV.1.2 *Activité biologique du hTNFR-Is produit par les cellules de la lignée stable*

Afin de contrôler l'activité biologique de la protéine chimérique hTNFR-Is/mIgG1 produite de manière constitutive par les cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1, nous avons effectué un test d'inhibition de cytotoxicité du TNF-α sur les cellules L929, dans les mêmes conditions que précédemment.
Le surnageant d'une culture de 24 heures de 125 000 cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 était mis en contact avec les cellules L929 en présence de TNF-α (200 pg/mL) et d'actinomycine D (4 µg/mL) pendant 18 heures, avant dosage colorimétrique au MTT. Les contrôles positif et négatif d'inhibition de la lyse induite par le TNF-α correspondaient à des surnageants de culture de cellules DBA/Tst non transfectées mises en incubation pendant 18 heures avec les cellules L929, en absence de TNF-α ou en présence de 200 pg/mL de TNF-α.
Un pourcentage de survie cellulaire de 69% a ainsi été obtenu, confirmant la bioactivité de la protéine produite par la lignée stable établie.

IV.2. Caractéristiques d'expression de la lignée autologue

L'expression constitutive de hTNFR-Is biologiquement actif par les cellules de la lignée cellulaire DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 a été contrôlée. Nous avons ensuite souhaité évaluer l'expression de hTNFR-Is obtenue *in vivo* suite à la greffe de 8.10^6 cellules.

IV.2.1 *Etude cinétique*

Nous avons évalué la production locale (dans le fragment de peau situé autour du site d'injection) de hTNFR-Is, mais aussi le taux circulant de protéine hTNFR-Is, à différents temps après injection des cellules.

IV.2.1-a) Expression locale de hTNFR-Is

La figure 50 montre une production locale de hTNFR-Is détectable pendant au moins deux semaines après la greffe de cellules, dans les lysats de peau prélevée autour du site d'injection des cellules. Le maximum d'expression était détecté dès le lendemain de la greffe, et s'élevait à 10 ng/mg de protéine.

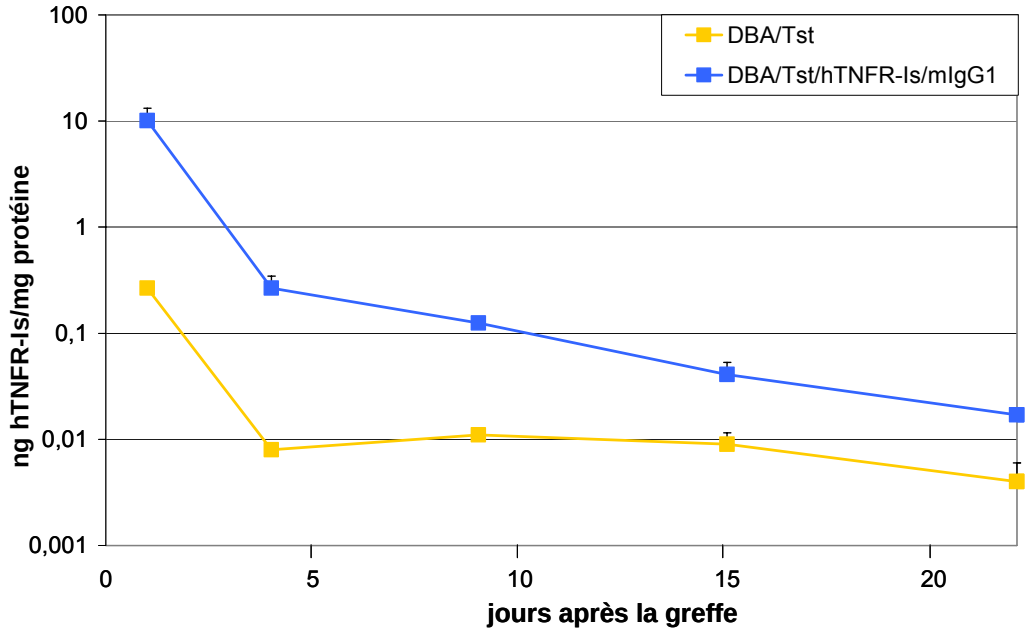


Figure 50 : Cinétique locale de production de hTNFR-Is in vivo après greffe de cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1. Les souris DBA/1 recevaient une injection sous-cutanée à la base du dos de 8.10^6 cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 ou DBA/Tst (contrôles) dans 100 µL de milieu RPMI. Les taux de hTNFR-Is étaient déterminés par ELISA dans des lysats de peau, et normalisés par la concentration de protéines dans le fragment de peau prélevé (n=3, moyenne + SEM).

IV.2.1-b) Expression systémique de hTNFR-Is

Nous avons aussi évalué les taux de hTNFR-Is dans le sérum des souris ayant reçu une greffe de cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 ou de cellules DBA/Tst contrôles. La protéine fusionnée était détectée dans le compartiment systémique sur toute la durée de l'expérience. Le maximum de protéine était détecté un jour après la greffe, à la valeur de 1µg/mL. Ce taux diminuait ensuite progressivement, mais était encore nettement détectable 22 jours après la greffe de cellules, date à laquelle on détectait encore environ 600 pg/mL de hTNFR-Is.

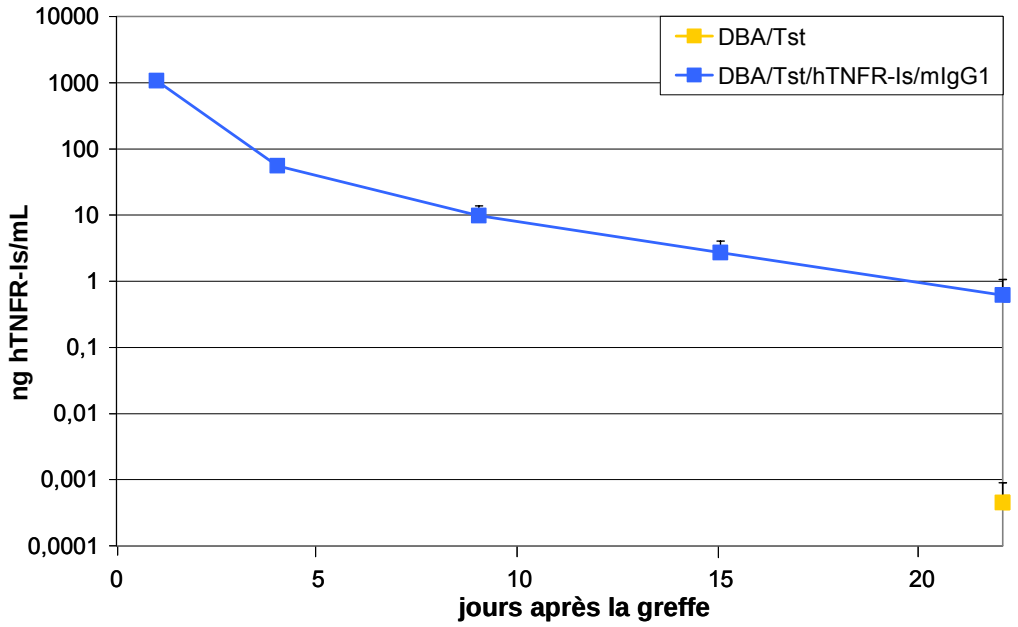
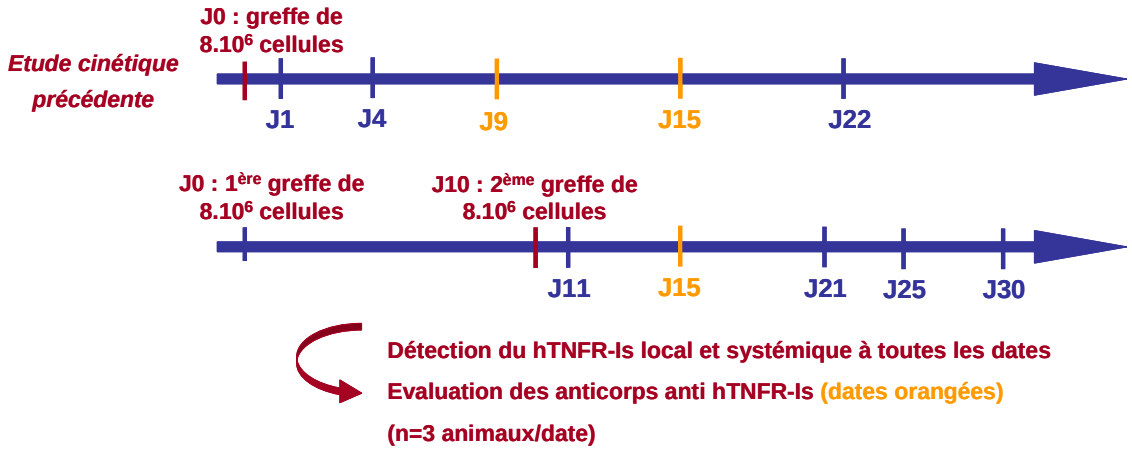


Figure 51 : Cinétique sérique de production de hTNFR-Is in vivo après greffe de cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1. Les souris DBA/1 recevaient une injection sous-cutanée à la base du dos de 8.10^6 cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 ou DBA/Tst (contrôles) dans 100 µL de milieu RPMI. Les taux de hTNFR-Is étaient déterminés par ELISA dans le sérum (n=3, moyenne + SEM).

IV.2.2 *Expression du transgène après une seconde administration de cellules autologues*

L'étude cinétique suivant la greffe de cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 mettait en évidence une décroissance rapide de détection de la protéine, principalement localement, celle-ci restant stable dans la circulation à plus long terme. Dans l'hypothèse d'un rejet des cellules greffées par leur hôte, nous avons voulu vérifier si une seconde greffe réalisée 10 jours après la première injection de cellules permettrait d'obtenir une production de hTNFR-Is aussi forte qu'après la première greffe. Cette étude avait pour but de déterminer le protocole à suivre dans le modèle d'AEC, dans lequel la maladie est suivie pendant au moins un mois.

Nous avons donc effectué deux greffes de 8.10^6 cellules à 10 jours d'intervalle, puis nous avons évalué les taux de hTNFR-Is 1, 5, 11, 15, et 20 jours après la seconde greffe (soit à J11, J15, J21, J25 et J30), pour les comparer aux taux obtenus aux même dates après une unique greffe de cellules.



IV.2.2-a) Expression locale de hTNFR-Is

L'étude des taux locaux de hTNFR-Is après la seconde greffe de cellules montrait que celle-ci ne permettait pas de réinduire l'expression de hTNFR-Is. En effet, un jour après la seconde greffe, soit 11 jours après la première greffe, le taux de hTNFR-Is détecté était de 225 pg/mg de protéine, ce qui est du même ordre de grandeur que le taux détecté 11 jours après une unique greffe de cellules (environ 100 pg/mg de protéine). La production de hTNFR-Is chutait ensuite rapidement et était négligeable dès 10 jours après la seconde greffe de cellules.

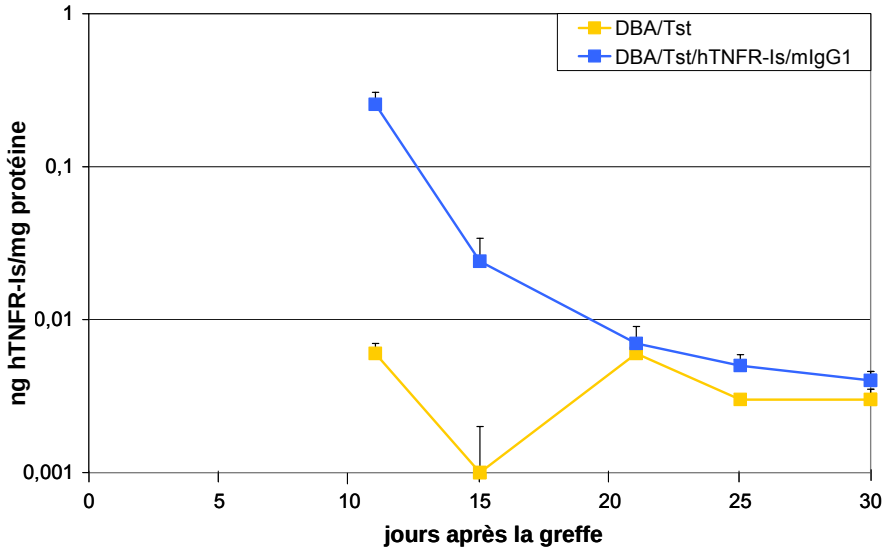


Figure 52 : Cinétique locale de production de hTNFR-Is in vivo après deux greffes de cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1. Les souris DBA/1 recevaient une injection sous-cutanée à la base du dos de 8.10^6 cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 ou DBA/Tst (contrôles) dans 100 µL de milieu RPMI à J0 et à J10. Les taux de hTNFR-Is étaient déterminés par ELISA dans des lysats de peau, et normalisés par la concentration de protéines dans le fragment de peau prélevé (n=3, moyenne + SEM).

IV.2.2-b) Expression systémique de hTNFR-Is

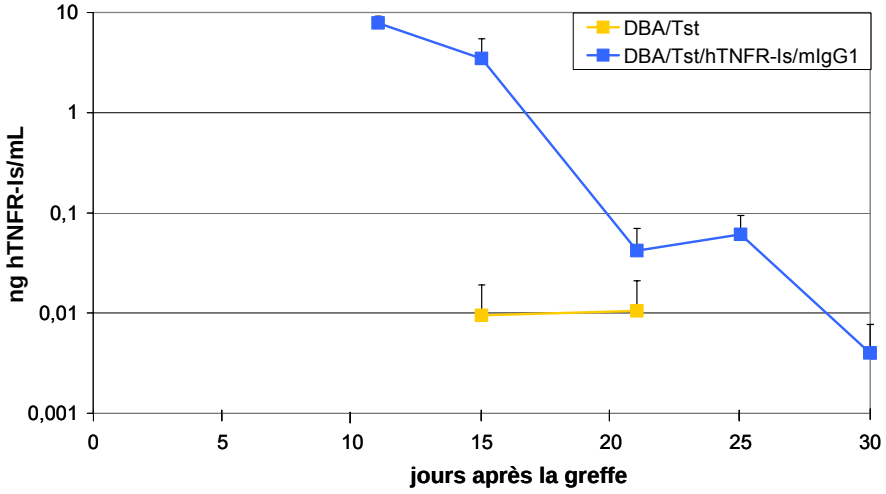


Figure 53 : Cinétique sérique de production de hTNFR-Is in vivo après deux greffes de cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1. Les souris DBA/1 recevaient une injection sous-cutanée à la base du dos de 8.10^6 cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 ou DBA/Tst (contrôles) dans 100 µL de milieu RPMI à J0 et à J10. Les taux de hTNFR-Is étaient déterminés par ELISA dans le sérum (n=3, moyenne + SEM).

De même, la réalisation d'une seconde greffe de cellules 10 jours après la première ne permettait pas de détecter à nouveau des taux élevés de hTNFR-Is systémique. En effet, le maximum de hTNFR-Is détecté dans la circulation était obtenu 11 jours après la première greffe (environ 7,8 ng/mL). Avec une unique greffe, le taux circulant à 11 jours est d'environ 8 ng/mL ; l'évolution des taux sériques dans les deux expériences était donc identique. De même, 15 jours après la première greffe, on détecte 2,7 ng/mL pour une injection unique de cellules, et 3,5 ng/mL à la même date, avec réinjection de cellules au dixième jour.

Cette expérience démontre l'inefficacité d'une seconde greffe de cellules car elle ne permet pas de réinduire la production de hTNFR-Is. La seconde greffe est donc inutile car elle ne relève pas les taux de hTNFR-Is obtenus après la première greffe. Dans l'hypothèse d'utiliser cette lignée pour le traitement de l'AEC, nous devrons donc tenir compte de la courte durée d'expression locale et sérique de protéine de fusion hTNFR-Is/mIgG1.

IV.2.3 ***Evaluation des anticorps anti hTNFR-Is***

Le taux de hTNFR-Is mesuré après la greffe de cellules chute assez rapidement, même si les cellules utilisées sont autologues. Nous avons donc voulu étudier la présence d'éventuels anticorps contre la protéine transgénique, suite à la greffe de cellules. Les anticorps ont été évalués à l'aide d'un dosage ELISA spécifique des anticorps anti hTNFR-Is, 9 jours après une unique greffe de cellules, et 15 jours après une unique greffe ou deux greffes (dates orangées sur le schéma de description de l'expérience). Le sérum de souris DBA/1 naïves était utilisé comme "blanc" pour déterminer les titres en anticorps (n=2 ou 3/date).

Le titre en anticorps du sérum de souris ayant reçu une unique greffe de cellules 9 jours auparavant était inférieur à 50 (n=3) ; ces souris n'ont donc pas d'anticorps Ig anti-hTNFR-Is. 15 jours après une unique greffe de cellules, les souris avaient toujours un titre inférieur à 50 (n=3). Par contre, chez les souris ayant reçu deux greffes (à J0 et J10), le titre d'anticorps à cette même date était supérieur voire très supérieur à 200 (n=2).
La chute de hTNFR-Is suite à une unique greffe de cellules ne peut donc pas être expliquée par la présence d'anticorps dirigés contre la protéine transgénique ; par contre, la réalisation d'une deuxième greffe entraîne une rapide production d'anticorps, qui sont présents à des taux élevés 5 jours après cette seconde greffe.
La présence de ces anticorps est en accord avec le profil cinétique observé lorsqu'on effectue deux greffes de cellules, et avec le fait que la deuxième greffe est "inutile".

DISCUSSION

Notre travail illustre la possibilité d'utiliser la thérapie génique à l'aide de variants du récepteur soluble du TNF-α dans différents modèles expérimentaux de pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes. Ce travail a nécessité la construction et la caractérisation de trois plasmides codant des variants du hTNFR-Is ainsi que la mise au point des méthodes d'électrotransfert intra-articulaire et intra-oculaire.

Nous avons caractérisé l'expression des variants du récepteur soluble du TNF-α selon la méthode de transfert de gène utilisée.
Nous avons ensuite pu confirmer l'importance du TNF-α comme médiateur délétère dans un modèle expérimental de polyarthrite rhumatoïde et d'uvéite ; nous ne sommes pas parvenu à évaluer l'importance de ce médiateur dans un modèle de traumatisme cérébral.

Notre discussion portera sur l'utilisation de différentes méthodes de vectorisation de l'ADN thérapeutique, sur la comparaison des différentes formes de récepteur soluble du TNF-α étudiées, et sur leur potentialité thérapeutique.

I. Stratégies de thérapie génique anti-TNF

Dans les pathologies étudiées, les traitements anti-inflammatoires classiques, à large spectre, restent décevants. Les recherches actuelles permettent de mieux connaître l'étiologie et la physiopathologie des maladies et d'identifier les processus importants afin d'établir des stratégies thérapeutiques. Ainsi, l'utilisation de molécules biologiques, dont plusieurs formes d'anti-TNF, se développe, certains composés sont même utilisés chez l'homme. Cependant, la protéothérapie reste une approche lourde à mettre en œuvre, nécessitant des productions importantes et coûteuses de protéine recombinante, et des injections répétées qui peuvent entraîner des effets indésirables.
L'utilisation de la thérapie génique présente l'intérêt de surmonter ces inconvénients tout en permettant une sécrétion continue, stable et prolongée de la protéine. Nous avons choisi d'utiliser des approches non virales de transfert de gène, électrotransfert et thérapie génique cellulaire.

Dans ce cadre, deux stratégies peuvent être envisagées : l'administration locale, fondée sur le transfert de gène directement dans l'organe cible de l'inflammation, et l'administration systémique, reposant sur la diffusion de la protéine thérapeutique dans la circulation sanguine. Chacune de ces stratégies a ses avantages et ses limites, et le choix de la voie d'administration du gène la plus efficace n'est pas toujours simple à résoudre.
La thérapie génique locale permet de limiter la diffusion dans tout l'organisme de la protéine thérapeutique, limitant ainsi les effets toxiques liés à une administration systémique. Cette voie d'administration permet aussi d'obtenir des concentrations importantes de la protéine thérapeutique dans le compartiment local (pour nous : articulation ou œil), ce qui est difficile à obtenir avec une approche systémique. Ceci réduit le risque d'exposer d'autres tissus ou organes non atteints à la protéine sécrétée. Par ailleurs, le compartiment local est beaucoup plus petit que le compartiment sanguin, ce qui nécessite une production beaucoup plus faible de la protéine pour obtenir un effet thérapeutique.
Selon la pathologie, la stratégie locale peut devenir beaucoup plus lourde. Cette voie d'administration est très intéressante pour l'œil, qui est touché individuellement par l'inflammation, mais devient complexe pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde puisque de nombreuses articulations peuvent être touchées. Dans ce cas l'approche locale peut présenter un intérêt pour traiter quelques articulations très atteintes.

Dans nos travaux, nous nous sommes intéressés à ces deux approches : l'approche systémique par électrotransfert intramusculaire et thérapie cellulaire, et l'approche locale par électrotransfert intra-articulaire et intra-oculaire.

I.1. Stratégies systémiques

I.1.1 *Electrotransfert intramusculaire*

La principale approche utilisée dans nos travaux, l'électrotransfert intramusculaire, a été choisie pour sa simplicité et son efficacité ; dans cette méthode, le muscle est utilisé comme une "pompe à protéines" afin d'obtenir un taux circulant intéressant de protéine thérapeutique.

La durée d'expression du transgène est un paramètre critique lié à l'utilisation de vecteurs de thérapie génique, notamment dans des maladies chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde. Par électrotransfert chez la souris, nous avons mis en évidence la production locale, dans le muscle, de protéine hTNFR-Is pendant au moins six mois, après une unique injection de 15 µg de plasmide pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, ou pCOR (hTNFR-Is)2. Seule la forme chimérique de hTNFR-Is était nettement détectée dans la circulation pendant au moins 6 mois (cette différence entre les trois formes de hTNFR-Is sera développée en II).
D'autres travaux, où un vecteur adénoviral avait été utilisé, ont montré que la forme protéine de fusion hTNFR-Is/mIgG1 était détectée dans le sérum pendant seulement quatre semaines après injection par voie intraveineuse chez la souris. Ceci peut être expliqué par une diminution de l'expression par "dilution" du transgène qui reste épisomal, ou par une extinction du promoteur CMV à l'intérieur de la cellule hôte[367]. L'un des intérêts à utiliser le muscle squelettique comme organe sécréteur après électrotransfert intramusculaire, est la faible activité mitotique des cellules musculaires qui empêche la "perte" du transgène après division cellulaire. Des travaux utilisant une forme dimérique du récepteur de type II du TNF-α humain produite suite à électrotransfert de 20µg de plasmide n'ont pas permis la détection de la protéine dans la circulation[385]. Une autre étude a été réalisée par électrotransfert de 15µg de plasmide codant une protéine de fusion hTNFR-IIs/hIgG1[355]. La protéine sécrétée était seulement détectée pendant 12 jours chez des souris DBA/1 tandis que l'expression chez des souris SCID était supérieure à 30 jours ce qui suggère une réponse immune.

D'autres études ont montré une expression à long terme du transgène vectorisé par électrotransfert et des effets thérapeutiques durables dans différents modèles expérimentaux. Des études ont ainsi montré une expression de luciférase pendant plus de 270 jours après électrotransfert intramusculaire de plasmide chez la souris[309], et pendant plus de 168 jours après électrotransfert de 10 µg d'un plasmide codant la phosphatase alcaline sécrétée humaine[346]. L'électrotransfert intramusculaire de 20 µg de plasmide codant l'érythropoïétine chez la souris induisait une augmentation du taux d'hématocrite de 35 à 80% pendant deux mois, celui-ci se maintenait entre 40 et 60% six mois après électrotransfert[348]. Par ailleurs, l'électrotransfert de 30µg de plasmide codant le facteur IX humain chez des souris immunodéficientes induisait une expression sérique stable d'environ 100 ng/mL pendant au moins deux mois, taux qui permettrait de réduire nettement la sévérité de la maladie[322].

Les quantités de protéine détectées dépendaient des doses de plasmide électrotransféré. Les trois variants étaient détectés dans le muscle dès électrotransfert de 1µg de plasmide et le taux produit suite à électrotransfert de 15µg de plasmide était élevé (environ 10 ng de hTNFR-Is/mg de protéine). Dans le sérum, la rapide élimination du monomère était mise en évidence, celui-ci n'étant détecté que

pour une dose de 15 µg de plasmide électrotransféré. En revanche, les protéines de fusion et dimérique étaient détectées dès électrotransfert de 1 µg de plasmide.

D'autres études ont montré un effet dose par électrotransfert. C'est le cas dans la cornée par injection de 0,1 à 10 µg de plasmide codant la luciférase, l'étude étant limitée par le volume pouvant être injecté[316]. Dans le cadre de la lutte contre la β-thalassémie, le taux d'hématocrite mesuré dépendait aussi de la quantité de plasmide électrotransféré dans le muscle. En ce qui concerne cette étude, les doses étaient proches de celles que nous avons utilisées : 1 à 20 µg, avec augmentation faible, mais non nulle de l'hématocrite dès 1 µg[348]. L'étude de la production d'insuline dans le muscle, après électrotransfert intramusculaire chez la souris de 10 à 200 µg de plasmide, montrait l'existence d'une dose optimale, pour 100 µg, et illustrait la possibilité d'une "saturation" de pénétration du plasmide, ou de production de protéine, dans un muscle[350].

L'immunogénicité liée à l'administration de vecteur *in vivo* est aussi l'un des paramètres essentiels de la thérapie génique. Ce phénomène peut en effet entraîner le rejet des cellules ayant intégré le transgène et altérer l'efficacité du transfert en cas d'administrations répétées du vecteur. C'est d'ailleurs le principal problème rencontré lors de l'utilisation des vecteurs adénoviraux. La réaction immune peut être dirigée contre le vecteur lui-même ou contre la protéine transgénique. Cette protéine peut être inconnue du système immun ; c'est le cas dans les déficiences génétiques, comme par exemple l'hémophilie, pathologie dans laquelle le facteur IX n'est pas exprimé. Elle peut aussi être connue par le système immun ; dans ce cas, elle ne devrait pas générer de réponse immune, ceci n'étant malheureusement pas le cas dans les processus auto-immuns. L'étude cinétique que nous avons effectuée suggère une absence de réponse immune puisque la protéine était encore produite dans le muscle plus de six mois après électrotransfert. Nous nous sommes assurés de l'absence de réponse immune humorale contre les protéines transgéniques produites par les cellules musculaires après électrotransfert. Le dosage ELISA spécifique des Ig anti hTNFR-Is effectué sur des sérum électrotransférés un mois auparavant avec 15µg de plasmide pCOR hTNFR-Is, pCOR hTNFR-Is/mIgG1, pCOR (hTNFR-Is)2 ou un mois après électrotransfert de 50 µg de plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1 confirmait l'absence d'anticorps spécifiques des hTNFR-Is chez la souris DBA/1.

De même, huit mois après électrotransfert d'un plasmide codant l'érythropoïétine, un deuxième électrotransfert du plasmide dans des conditions identiques induisait une réaugmentation de l'hématocrite à un taux identique à celui obtenu lors du premier électrotransfert, suggérant l'absence de réponse immunitaire dirigée contre le vecteur ou le transgène[348]. Cependant, l'électrotransfert de fortes doses de plasmide codant la luciférase chez des souris C57Bl6 entraînait la production d'anticorps contre la luciférase dès deux semaines après électrotransfert[386]. En outre, une étude réalisée par électrotransfert de 20µg d'un plasmide codant une forme dimérique du hTNFR-IIs conduisait à la production d'anticorps dirigés contre la protéine transgénique dans le sérum[385]. De même, l'électrotransfert d'un plasmide codant une protéine de fusion du hTNFR-IIs conduisait à une expression à court terme, qui était améliorée chez des souris immunodéficientes[355].

Des travaux visant à étudier la dissémination du plasmide électrotransféré à travers l'organisme ont aussi été menés, afin de s'assurer de la "sécurité" de la méthode. Nous avons ainsi effectué une étude par PCR, dans divers organes prélevés chez la souris, afin de déterminer si le plasmide électrotransféré dans le muscle diffusait dans d'autres organes. Nous avons mis en évidence que le plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1 injecté était localisé dans le muscle tibial cranial injecté et dans le triceps voisin deux semaines après électrotransfert, ce qui peut s'expliquer par une injection imprécise dans le muscle tibial cranial ou par une diffusion locale. Le plasmide n'était en revanche détecté dans aucun autre organe (foie, rate, rein, cœur, poumon, cerveau, gonade), et il n'y a donc pas eu de

diffusion par voie sanguine. D'autres études réalisées après électrotransfert d'un plasmide codant l'érythropoïétine dans la peau de rat[312], ou après électrotransfert dans le muscle squelettique d'un plasmide codant la proinsuline[350], toutes deux menées par RT-PCR, ont prouvé que le plasmide injecté ne diffusait pas.

L'électrotransfert intramusculaire semble donc une méthode de choix en thérapie génique, de part son efficacité, sa simplicité de mise en oeuvre, la "sécurité" liée à l'absence de dissémination du plasmide, mais aussi son expression à long terme qui ne nécessite pas d'injections répétées.
Cependant, cette apparente biosécurité de la procédure d'électrotransfert intramusculaire doit être nuancée par la mise en évidence de phénomènes rares d'intégration génomique de l'ADN plasmidique[334]. En effet, l'intégration aléatoire du transgène dans le génome peut avoir lieu dans une région codante du génome et empêcher l'expression d'un gène. Elle peut aussi avoir lieu dans une zone de régulation de l'expression d'un gène et par conséquent perturber son expression. Ce problème a été rencontré par l'équipe d'Alain Fischer, dont le vecteur rétroviral utilisé pour soigner une immunodéficience liée à l'X s'est intégré de manière préférentielle dans une région d'activation du proto-oncogène LMO2, entraînant sa surexpression et le développement de leucémie chez certains des patients traités.

I.1.2 *Thérapie génique cellulaire*

Nous avons souhaité développer une approche systémique alternative à l'électrotransfert intramusculaire ; notre choix s'est porté sur une approche par thérapie génique cellulaire autologue, qui s'était déjà révélée efficace au laboratoire dans le modèle d'arthrite expérimentale au collagène[366].
Le variant choisi pour établir cette lignée était le plasmide codant la forme chimérique du hTNFR-Is.
Nous avons ainsi établi une lignée stable DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 qui exprimait 73 ng de hTNFR-Is/10^6 cellules/24 heures, ceci est élevé comparé à la production de la lignée stable, précédemment établie au laboratoire, de cellules DBA/Tst/mIL-4 qui produisait 3 ng d'IL-4/10^6 cellules/24 heures[366].
Ce résultat peut s'expliquer par la différence de plasmide utilisé qui est un plasmide pCOR dans le cas du gène hTNFR-Is/mIgG1, contenant très peu de séquences bactériennes susceptibles d'interférer avec l'expression des gènes eucaryotes et est relativement petit, tandis que le gène de l'IL-4 était placé dans un plasmide de taille plus importante (BMG).

L'étude cinétique réalisée en greffant 8.10^6 cellules en sous-cutané *in vivo* montre qu'un taux élevé de protéine était détecté localement (fragment de peau situé autour du site de l'injection) dès le lendemain de la greffe (environ 10 ng de hTNFR-Is/mg de protéine), suivi d'une rapide décroissance de l'expression locale de la protéine de fusion en deux semaines. L'expression de protéine étant constitutive, il est normal que l'expression soit maximale dès l'injection des cellules. Les dosages sériques mettaient en évidence une sécrétion importante de protéine (environ 1 µg de hTNFR-Is/mL le lendemain de la greffe), et une décroissance plus lente du taux systémique de protéine de fusion, explicable par la stabilité sérique de cette forme de protéine. En effet, le lenercept, qui est proche de la protéine chimérique étudiée a une demi-vie d'environ 5 jours.

Afin de mieux comprendre la cause de la décroissance de protéine détectée, nous avons effectué une seconde greffe du même nombre de cellules 10 jours après la première greffe, espérant réinduire une expression de protéine à des taux identiques à ceux obtenus suite à la première greffe. Mais cette seconde greffe n'a eu aucun effet sur l'expression de hTNFR-Is qui gardait le même profil de décroissance que celui observé par une seule injection de cellules. Ceci suggère une réponse

immune contre la protéine transgénique ou contre les cellules DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1. Nous avons donc réalisé un dosage ELISA spécifique des anticorps Ig anti-hTNFR-Is. Neuf et quinze jours après une unique injection de cellules, aucun anticorps n'était détecté dans le sérum des souris traitées. Par contre, cinq jours après la deuxième greffe de cellules, les souris présentaient un fort titre d'anticorps. Il y a donc bien une stimulation immune contre la protéine transgénique suite à la première greffe, qui explique l'inefficacité de la seconde greffe, laquelle induit une production immédiate d'un fort taux d'anticorps.

Cependant, ces résultats n'expliquent pas la décroissance de protéine observée suite à une unique injection de cellules. Celle-ci peut être liée à une réponse immune contre les cellules elles-mêmes. En effet, Les cellules DBA/Tst sont des cellules syngéniques, mais elles ont été modifiées par l'antigène T de SV40 pour être immortalisées et cette modification peut être à l'origine d'une réaction de rejet des cellules greffées.

Peu de données existent sur la production de protéine transgénique après greffe de cellules génétiquement modifiées. Plusieurs études ont été réalisées à partir des fibroblastes autologues DBA/Tst infectés par un rétrovirus codant l'IFN-β[229], le récepteur I du complément[387] ou transfectées par un plasmide codant l'IL-4[366]. Dans ces études, le profil d'expression *in vivo* de l'IL-4 ou de l'IFN-β n'a pas été étudié, mais ces lignées exprimaient la protéine transgénique *in vitro* et étaient efficaces pour traiter l'arthrite expérimentale au collagène. Le récepteur I du complément n'a quant à lui pas pu être dosé, mais l'utilisation de cette lignée était aussi efficace dans un modèle expérimental de polyarthrite.

Des fibroblastes xénogéniques (CHO) ou des kératinocytes humains transfectés par des cytokines ou anti-cytokines ont été utilisés dans des modèles expérimentaux de polyarthrite[227,271,272]. Ces cellules permettaient une production continue de taux thérapeutiques de protéine pendant quelques jours, mais étaient ensuite éliminées par le système immunitaire. Cependant, cette production permettait déjà d'obtenir des effets thérapeutiques intéressants. Le rejet de ces cellules pouvait être évité par l'encapsulation des cellules d'intérêt dans un polymère biocompatible[388]. Cette utilisation de cellules encapsulées fait d'ailleurs l'objet d'essais cliniques de phase I/II pour délivrer du CNTF par voie intra-oculaire ou intra-thécale chez des patients touchés par une rétinite pigmentaire ou une sclérose latérale amyotrophique, respectivement.
D'autres types cellulaires peuvent être utilisés. Par exemple, pour le traitement de modèles expérimentaux de polyarthrite rhumatoïde, des splénocytes infectés par un rétrovirus codant une forme monomérique du récepteur soluble du TNF-α ont été utilisés avec succès[389,390] ; dans ces deux études, des taux systémiques importants de TNFRs étaient détectés, mais ne corrélaient pas avec les effets cliniques observés ; ces résultats mettent en évidence l'importance du taux local d'inhibiteur du TNF-α et non de son taux systémique élevé. Des cellules dendritiques infectées par un rétrovirus ou un adénovirus codant l'IL-4 étaient aussi très efficaces dans les modèles expérimentaux d'arthrite, bien que la protéine ne soit pas détectée dans le sérum des animaux traités[278,391].

Dans le cadre de notre étude, il aurait pu être intéressant de suivre les cellules transfectées *in vivo* chez la souris, en profitant du développement de dispositifs d'imagerie optique et de la possibilité de marquer les cellules, par exemple. De tels suivis ont été réalisés après injection de cellules dendritiques, par cytométrie de flux ou dosage de la luciférase dans les organes où les cellules sont susceptibles d'avoir migré ; ces études mettaient en évidence la migration des cellules dendritiques dans la rate[278,391].
Par ailleurs, il serait intéressant de savoir si la greffe de moins de cellules ne serait pas plus intéressante. En effet, on peut supposer que si une quantité moins importante de hTNFR-Is est

produite suite à la première greffe, les cellules mémoires du système immunitaire ne seront pas activées. La seconde greffe pourrait alors permettre de réinduire la production de protéine thérapeutique. Une production plus faible mais à plus long terme de récepteur soluble du TNF serait peut être plus efficace pour inhiber le développement de l'arthrite expérimentale au collagène.

I.2. Stratégies locales

Ce type de stratégie est spécialement intéressant à développer pour l'utilisation d'anti TNF-α dont les effets systémiques sont à prendre en compte[193]. Les principaux effets secondaires néfastes des traitements systémiques par anti-TNF, infliximab ou etanercept, sont :

- des risques de réactions d'infusion spécifiques à l'infliximab,
- des réactions d'hypersensibilité,
- des infections variées,
- des réactions auto-immunes,
- des désordres lymphoprolifératifs,
- des effets cardiaques et neurologiques.

L'effet indésirable majeur est le risque d'infections. Les plus communes sont les infections respiratoires (sinusites, pharyngites, bronchites) et les infections urinaires étendues. La plus grave est le risque de développer une tuberculose ; elle est majoritairement rencontrée chez les patients atteints de PR ou de la maladie de Crohn traités par infliximab. Quelques cas de listérioses ou pneumonies ont été rapportés.
Par ailleurs, quelques cas de lymphomes non hodgkinien semblent avoir été détectés.

Nous avons souhaité développer une approche locale dans deux cadres différents : le transfert de gène intra-articulaire pour le traitement de pathologies articulaires, dans notre cas, le modèle de l'arthrite expérimentale au collagène ; le transfert de gène intra-oculaire avec comme première application de traitement d'une uvéite expérimentale.

I.2.1 *Electrotransfert intra-articulaire*

Cette approche locale a été initialement développée à l'aide de stratégies cellulaires *ex vivo* visant à infecter des fibroblastes synoviaux[392-394]. Elle a donné lieu à une étude clinique de phase I qui a démontré la faisabilité de cette méthode[395]. Depuis, le traitement local de l'articulation s'est développé avec utilisation d'injections locales directes à l'aide de vecteurs viraux ou chimiques[396].

Nous avons choisi de mettre au point cette méthode chez la souris, afin de pouvoir l'appliquer au modèle d'arthrite expérimentale au collagène. L'électrotransfert intra-articulaire a pour l'instant été décrit chez le rat par deux équipes utilisant des conditions électriques différentes[328,373]. L'équipe d'Ohashi a mis en évidence une augmentation de l'expression du gène rapporteur luciférase par rotation de l'électrode autour de l'articulation, ce qui est en accord avec des études effectuées *in vitro* ou sur le muscle squelettique montrant l'importance de l'orientation des électrodes pour optimiser le transfert de gène par électrotransfert[326,327]. Les conditions optimales définies par l'équipe d'Ohashi étaient de 12 impulsions bipolaires dans deux directions orthogonales (3 impulsions antérieures-postérieures suivies de 3 impulsions de même direction et de polarité inverse, puis 3 impulsions latérales suivies de 3 impulsions de même direction et de polarité inverse) de 200V/cm, de durée 100ms et à la fréquence de 1Hz. L'équipe de Grossin a utilisé des conditions électriques plus proches

des conditions classiquement utilisées pour le muscle, à savoir 8 impulsions de 20ms, à la fréquence de 1Hz, et avec une intensité de champ de 250V/cm, l'une des électrodes étant disposée sur la rotule et l'autre sur la face postérieure de l'articulation.

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser les conditions électriques établies par Florence Apparailly (INSERM U475, communication personnelle) chez la souris : 12 impulsions de 20ms, à 2Hz, avec une intensité de champ de 250V/cm. Nous avons tenté d'optimiser ces conditions électriques par la rotation de l'électrode, mais sans succès. Les électrodes ont donc été placées en antérieur-postérieur pour toutes les expériences décrites.
Nous avons ainsi tout d'abord vérifié l'efficacité de la procédure d'électrotransfert en comparant l'expression de luciférase obtenue par injection intra-articulaire seule, ou suivie d'un électrotransfert. Nous avons obtenu en moyenne une expression 500 fois supérieure grâce aux impulsions électriques. La procédure optimisée par l'équipe de Ohashi leur permettait d'obtenir une expression environ 100 fois plus élevée chez le rat[328].

Dans nos travaux, la localisation de l'expression n'a pas été étudiée avec précision. Nous avons utilisé l'électrotransfert d'un plasmide portant le gène rapporteur luciférase et un dispositif d'imagerie optique pour visualiser macroscopiquement la localisation des cellules transfectées, qui semblaient bien situées au niveau du genou de la souris. Nous avons utilisé un plasmide codant la protéine GFP, qui permet une localisation plus précise de l'expression du transgène par imagerie optique, mais aucune expression de GFP n'a été détectée, peut-être à cause de la rapide absorption de la fluorescence par les tissus. Ce même plasmide GFP a été utilisé pour réaliser des analyses histochimiques sur des coupes de patte après décalcification des os de la patte, mais là encore, la GFP n'a pu être détectée. Le traitement décalcifiant peut avoir dénaturé la protéine GFP qui n'est plus visible en microscopie de fluorescence. Nous envisageons d'effectuer des analyses par coupes histologiques sur des articulations électrotransférées à l'aide d'un plasmide LacZ, la coloration β-Galactosidase ayant été validée au laboratoire. Cette étude nous permettrait de déterminer le type de cellules transfectées par électrotransfert intra-articulaire.
En effet, selon les conditions d'injection et d'électrotransfert, le type cellulaire transfecté est différent. Ainsi, chez le rat, la transfection de chondrocytes des couches superficielles et profondes a été mise en évidence[373] ; un et deux mois après électrotransfert, l'expression n'était maintenue que dans les chondrocytes profonds qui représentent 30% de l'ensemble des chondrocytes. Cependant, l'ADN semblait toujours présent dans les couches superficielles du cartilage, mais son expression était réprimée. D'autres conditions de traitement conduisaient à la transfection des cellules synoviales[328] et non des chondrocytes. Dans ce cas, l'expression atteignait un maximum trois jours après électrotransfert et retombait au niveau basal en deux semaines.
Les chondrocytes semblent plus difficiles à transfecter du fait de l'importance de la matrice extracellulaire, mais cette transfection est intéressante car les chondrocytes sont des cellules qui se divisent peu. Cependant, les résultats obtenus par l'équipe de Grossin[373] montraient que rapidement, seuls les chondrocytes hypertrophiques profonds exprimaient le transgène, ce qui pourrait être un obstacle à la sécrétion de la protéine d'intérêt.

Nos études mettent en évidence une expression du transgène pendant environ deux semaines après électrotransfert pour les trois formes étudiées. A noter la faible expression de la protéine dimérique dans toutes les études intra-articulaires (discuté en II).
Les taux locaux obtenus étaient de l'ordre du ng/mL ; ces valeurs étaient obtenues par dosage du milieu de culture mis en incubation durant 24 heures en présence des articulations prélevées, il est donc difficile de savoir quelle concentration de hTNFR-Is dans le liquide synovial cela peut représenter. Toutefois, les taux détectés étaient élevés, et le volume de liquide synovial chez la souris,

même arthritique, est faible ; ces résultats sont donc plutôt encourageants. Le maximum sérique obtenu était atteint par la protéine chimérique et s'élevait à environ 0,5 ng/mL. Ce taux n'est pas négligeable comparé aux 3 ng/mL de cette même protéine sécrétée par le muscle électrotransféré avec 15 µg de plasmide, qui permettait d'obtenir une inhibition modérée des signes cliniques de l'AEC, mais reste cependant un taux circulant assez faible pour probablement éviter tout risque d'effet secondaire indésirable. Une étude réalisée à l'aide d'un vecteur AAV codant une protéine fusionnée de TNFR-IIs[397] mettait en évidence une sécrétion de protéine deux à trois fois moins élevée par injection intra-articulaire de l'AAV comparée à une approche systémique par injection intramusculaire.

La rapide décroissance observée nous a conduit à doser les anticorps dirigés contre la protéine transgénique (luciférase ou hTNFR-Is). 13 jours après électrotransfert de 60µg de plasmide codant la luciférase, toutes les souris possédaient des anticorps anti-luc (n=4). Les résultats étaient plus variables selon les variants du hTNFR-Is (discuté en II), mais 10 et 14 jours après électrotransfert de 40 µg de plasmide codant la protéine de fusion, toutes les souris étaient immunoréactives (n=6), tandis que la même dose de plasmide codant le monomère n'induisait une réponse immune que chez une souris sur six. Cependant, le même profil de décroissance était observé dans ces deux groupes (pVAX2 hTNFR-Is et pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1), ce qui suggère une autre cause de décroissance de l'expression. Le transgène n'étant vraisemblablement pas intégré dans le génome suite à l'électrotransfert, cette décroissance peut être liée aux divisions cellulaires des cellules synoviales transfectées.
En effet, le même profil cinétique était obtenu par l'équipe d'Ohashi qui a mis en évidence la transfection exclusive de synoviocytes par sa méthode d'électrotransfert chez le rat[328]. Dans le cas de chondrocytes transfectés, une hypothèse de répression du promoteur a été avancée pour expliquer la décroissance de l'expression[373], mais cette hypothèse n'a pas encore été complètement vérifiée.

La plupart des études de transfert de gène dans l'articulation ont été effectuées à l'aide de vecteurs viraux. Les vecteurs adénoviraux ou rétroviraux permettaient d'obtenir une cinétique d'expression similaire à celle que nous avons obtenu par électrotransfert, sur environ deux semaines[396]. L'utilisation d'un vecteur lentiviral codant l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 en injection intra-articulaire chez le rat permettait une expression du transgène pendant 20 jours chez des rats immunocompétents, et supérieure à six semaines chez des rats immunodéficients, soulignant ainsi l'importance de la réponse immune contre la protéine transgénique[398]. Une étude réalisée par injection intra-articulaire d'un AAV codant le monomère du TNFR-Is humain permettait pourtant de détecter la protéine dans l'articulation pendant deux mois, mais celle-ci n'était pas mesurée dans le sérum[399]. Un vecteur AAV codant une forme chimérique du TNFR-IIs de rat et injecté dans l'articulation permettait d'obtenir une sécrétion de protéine pendant quatre mois[397].
Dès 1995, une étude a montré l'efficacité du transfert de gène par injection d'ADN nu dans l'articulation ; cette méthode permettait de transfecter les synoviocytes, et conduisait à une expression du transgène pendant cinq jours après injection de 160µg d'ADN par articulation[246]. L'utilisation de vecteurs chimiques a aussi été envisagée pour cette approche locale, mais l'expression protéique n'était obtenue que pendant une semaine[396].

L'inflammation de l'articulation entraînant une prolifération des cellules synoviales, une meilleure expression du transgène pourrait être observée lors du traitement d'animaux malades. Par notre procédure d'électrotransfert intra-articulaire, nous n'avons pas observé un taux local significativement plus élevé de protéine thérapeutique. En revanche, le taux sérique était deux fois plus élevé chez les animaux arthritiques comparés aux animaux sains. Deux études antérieures, effectuées à l'aide de vecteurs AAV montraient des résultats opposés. L'équipe de Pan a ainsi mis en évidence une expression locale du transgène significativement supérieure dans les articulations d'animaux

malades[400], ceci peut s'expliquer par le fait que les vecteurs AAV transfectent plus facilement les cellules en division, mais l'équipe d'Oligono n'a pas observé d'amélioration d'expression locale chez les animaux malades par injection d'un AAV codant l'IL1-Ra[396].

Nous avons étudié l'influence de la dose de plasmide injecté sur l'expression locale et systémique de protéine. Nous avons ainsi observé une augmentation des taux local et sérique de protéine pour une augmentation de la dose de plasmide injectée, entre 5 et 20 µg. Par contre, les taux observés suite à l'injection de 20 à 60 µg de plasmide étaient du même ordre pour les trois variants étudiés (seule différence statistiquement significative : augmentation du taux de protéine systémique entre 20 et 40µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 électrotransféré). Les taux sériques obtenus étaient ici plus élevés que ceux obtenus lors de l'étude cinétique, les expériences avaient pourtant été effectuées avec les même préparations de plasmide et des souris de même souche et même âge. Ce phénomène de "saturation" du compartiment a déjà été observé par électrotransfert intramusculaire[350], la limitation d'expression pouvant être liée à la capacité de pénétration du plasmide ou à la capacité de production de protéine par les cellules transfectées. Cette relation dose de plasmide/production de protéine n'a pu être mise en évidence par injection seule de plasmide dans l'articulation[246], la variabilité de la méthode étant trop importante ; nous pouvons donc supposer que, comme cela a été démontré pour l'électrotransfert intramusculaire, l'électrotransfert intra-articulaire permet de réduire la variabilité interindividuelle comparée à la simple injection d'ADN.

I.2.2 *Electrotransfert intra-oculaire*

L'œil est une cible très intéressante pour la thérapie génique[401,402]. En effet, les traitements utilisés à l'heure actuelle dans les pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes ont une faible sélectivité, une efficacité limitée, et restent toxiques. Or la plupart de ces pathologies sont progressives ou chroniques et requièrent un traitement à long terme ; il est donc très important de minimiser les effets secondaires et de développer de nouvelles approches. Les principaux intérêts de l'œil sont son accessibilité et sa situation immuno-privilégiée. L'efficacité du traitement peut, de plus, être évaluée de manière non invasive.

Les premiers essais de thérapie génique intra-oculaire ont été réalisés à l'aide de vecteurs viraux[403,404], mais posaient des difficultés de préparation des particules virales, ainsi que des problèmes de toxicité et d'induction de réponse immune qui devront être résolu avant une application possible chez l'homme pour le traitement de pathologies non mortelles. Depuis quelques années se développe donc l'utilisation de méthodes non virales de thérapie génique. Les méthodes principalement utilisées sont l'implantation de cellules génétiquement modifiées[405,406], ces dernières pouvant être encapsulées[407], ainsi que la méthode d'électrotransfert[316,378]. Les principales cellules ciblées par l'électrotransfert, à l'heure actuelle, sont les cellules de l'endothélium cornéen[316,378], les cellules de la conjonctive[380], les cellules des ganglions rétiniens[317,376,408], et les cellules rétiniennes[377].

Nous avons choisi de développer une approche d'électrotransfert intra-oculaire dans le muscle ciliaire, qui présente l'avantage d'être facilement accessible. La faisabilité de l'électrotransfert dans un muscle lisse a récemment été illustrée par la transfection de la vasculature mésentérique[409]. La transfection de ces myofibres devrait permettre d'obtenir un niveau et une durée d'expression intéressante. Le dispositif d'électrodes nécessaire pour réaliser cet électrotransfert a pu être construit au sein du laboratoire. Le choix des conditions électriques s'est fondé sur les conditions "optimisées" pour le transfert de gène dans le muscle tibial cranial de la souris : 8 impulsions de 20 ms à 200V/cm, et à

une fréquence plus élevée de 5Hz, ce qui permet d'améliorer l'expression comparé à la fréquence de 2Hz classiquement utilisée[410].
Une première série d'expériences nous a permis de contrôler la sécurité de la méthode, qui ne provoquait pas de brûlures, d'infiltration cellulaire, et n'induisait pas d'inflammation locale (dans le modèle d'uvéite, le taux de TNF-α n'est pas augmenté par électrotransfert de solution saline, comparés aux animaux non injectés). L'utilisation du gène rapporteur GFP a permis de contrôler l'expression du transgène et sa localisation exclusive dans le muscle ciliaire. De plus, l'intérêt de la méthode d'électrotransfert était mis en évidence par l'absence d'expression du gène rapporteur GFP par injection seule du plasmide.

Différentes conditions électriques ont été utilisées pour effectuer un électrotransfert intra-oculaire, selon le type de cellules à transfecter et le type d'électrodes utilisées, qui donnent une distribution du champ électrique très variable[335]. Ainsi, des conditions assez proches des notres ont permis la transfection de cellules de la cornée[316] à l'aide d'électrodes plates, ainsi que des cellules de l'endothélium cornéen[378] à l'aide d'électrodes pinces. Par contre, des impulsions à champ beaucoup plus faible ont été utilisées avec des électrodes de type pinces qui entourent l'ensemble de l'oeil afin de transfecter les cellules des ganglions rétiniens ou de la conjonctive : deux séries, à cinq minutes d'intervalle, de cinq impulsions de 5 à 12 V/cm d'une durée de 50-100ms[380,408]. De même, une série de huit impulsions de durée 50ms à 20V/cm permettait de transfecter efficacement les cellules de l'endothélium cornéen[378], avec le même type d'électrode pinces. Récemment, un dispositif cathodique de type "lentille de contact" associé à une anode aiguille a été utilisé, avec deux séries de cinq impulsions de 100ms à 6V/cm, l'intensité de champ appliquée était faible étant donné l'écartement de 1cm entre les électrodes[376].

Les dommages cellulaires ainsi que la présence d'une inflammation locale sont des facteurs beaucoup plus importants et sensibles pour un électrotransfert de l'œil comparé au muscle. Ces facteurs ont donc été étudiés dans tous les travaux cités précédemment. Quelques dommages oculaires et cellules apoptotiques[376] ainsi qu'une légère néovascularisation[379] ont parfois été observés. L'augmentation de l'intensité du champ électrique pouvait entraîner une apoptose des cellules locales et une infiltration de cellules inflammatoires[379].
Toutes les procédures utilisées permettaient une expression du transgène localisée à la zone des électrodes. Pour cette raison, nous souhaitons actuellement développer un dispositif d'électrodes différent, dans lequel la cathode ne serait pas un simple fil conducteur, mais un dispositif multi-aiguilles, ou de forme annulaire, afin d'augmenter les surfaces conductrices, et donc la zone transfectée.

Nous avons ensuite évalué le profil cinétique obtenu suite à électrotransfert de 3µg de plasmide codant le gène rapporteur luciférase. L'expression du transgène était supérieure à un mois, avec à cette date une expression de 20% du niveau maximal obtenu cinq jours après électrotransfert. Cette étude est toujours en cours afin d'évaluer l'expression de protéine obtenue deux et trois mois après électrotransfert.
Les études précédentes effectuées par électrotransfert montraient des cinétiques assez variables, de 7 jours d'expression en luciférase[316], 20 jours en protéine GFP, MMP-3 ou LacZ[378-380], un mois[317] et même supérieure à 50 jours en GFP [377]. Les résultats que nous avons obtenus, avec une faible dose de plasmide, semblent donc très intéressants.

Afin de contrôler la capacité de sécrétion, et d'évaluer le taux de protéine thérapeutique, nous avions effectué un électrotransfert de 30µg de plasmide codant la protéine de fusion hTNFR-Is/mIgG1. Le taux de protéine était évalué dans l'humeur aqueuse car le modèle expérimental de pathologie que nous souhaitions étudier : l'uvéite expérimentale aux endotoxines, est un modèle d'inflammation

antérieure de l'œil. Comparée aux yeux contrôles non injectés ou injectés par une solution saline, l'injection seule de 30µg de plasmide permettait une expression modérée de protéine hTNFR-Is (environ 270 pg/mL) tandis que l'injection suivie d'un électrotransfert permettait une expression plus élevée d'environ 690 pg/mL, soit 2,5 fois plus que par injection seule. Une seconde série d'expériences permettait, à la même dose de plasmide, d'augmenter l'expression d'un facteur 5. La protéine d'intérêt était donc efficacement sécrétée dans l'humeur aqueuse.
A cette forte dose de plasmide, aucun hTNFR-Is n'était détecté dans la circulation. Ce résultat est important car l'utilisation en essais cliniques d'anti-TNF s'est avérée efficace mais entraîne des effets secondaires indésirables dus à l'administration systémique et à forte dose de la protéine recombinante[124,125].

II. Comparaison des variants du hTNFR-Is

Nous avons souhaité comparer, dans nos études, trois formes différentes de hTNFR-Is :

- la forme physiologique du hTNFR-Is (M≈25kD), monomérique, connue comme étant instable dans la circulation, mais qui pourrait être intéressante pour une approche locale
- la forme chimérique hTNFR-Is/mIgG1 (M≈100kD), dont l'efficacité de la protéine recombinante en utilisation systémique a été démontrée, mais qui n'avait pas été étudiée par l'approche d'électrotransfert intramusculaire, ni par les approches locales que nous avons développées
- une forme "intermédiaire" dans laquelle les deux fragments de hTNFR-Is sont reliés par un espaceur. Nous espérions que cette protéine dimérique (M≈50kD), plus petite que la forme fusionnée à l'IgG1 soit plus facilement sécrétée car elle est plus petite, tout en conservant une bonne affinité pour le TNF-α trimérique, l'espaceur choisi permettant à la molécule de conserver une bonne souplesse.

II.1. Activité biologique

Nous avons étudié l'activité biologique des plasmides construits pour nos études par évaluation du pourcentage de survie des cellules L929 en présence de TNF-α et des variants du hTNFR-Is. Nos résultats montraient que les trois plasmides construits permettaient d'obtenir une protéine capable de lier le TNF-α *in vitro*. Il n'y a donc pas eu de mutations ou de modifications des transgènes obtenus à partir d'ARN extraits de cultures cellulaires ou d'organes, et utilisés pour les clonages (vérifié aussi par séquençage). Dans le cas du pCOR (hTNFR-Is)2, l'espaceur choisi pour relier les deux fragments de monomère aurait pu entraîner des modifications conformationnelles inattendues masquant le site de fixation du TNF-α, et empêchant ainsi la liaison au TNF-α ; cependant, la protéine obtenue est bien fonctionnelle.

Nous avons ainsi montré que le pourcentage de survie des cellules L929 en présence de TNF-α était de 6% pour le monomère, 65% pour la protéine de fusion et 71% pour le dimère, en présence des surnageants de transfection des différents plasmides.
Ces données permettent de comparer la capacité de liaison au TNF-α des différents variants, les concentrations en récepteur soluble du TNF-α ayant été normalisées avant incubation avec les cellules L929. Dans le cas du monomère, la faible activité inhibitrice observée peut s'expliquer par le fait que cette molécule ne se lie qu'à une des sous-unités du TNF-α trimérique, ce qui n'inhibe pas nécessairement son activité. Les deux sous-unités du TNF-α restant libres peuvent en effet se lier au récepteur membranaire et transduire un signal dans la cellule cible. De plus, le récepteur soluble monomérique ayant une affinité relativement faible pour le TNF-α (Ka $\approx 2.10^6$ M^{-1}), il doit être présent en large excès pour inhiber l'action du TNF-α. La protéine de fusion hTNFR-Is/mIgG1 peut en revanche se lier à deux des trois sous-unités du TNF-α, et inhiber ainsi son activité biologique[411]. De plus, l'affinité de la protéine de fusion pour le TNF-α (Ka $\approx 10^{11}$ M^{-1} [367]) est plus élevée que celle du monomère ; ceci explique l'efficacité d'inhibition de la protéine de fusion sur la lyse induite par le TNF-α sur les cellules L929. La protéine dimérique ayant une activité inhibitrice voisine de celle de la protéine de fusion, nous pouvons supposer que l'espaceur utilisé pour relier les deux fragments du récepteur soluble ne modifie pas la géométrie de la molécule par rapport à la protéine chimérique, ou tout du moins, que les affinités de ces deux molécules pour le TNF-α sont du même ordre de grandeur. Le dimère est sans doute aussi capable de lier le TNF-α trimérique par deux de ses sous-unités. La protéine dimérique présente donc des avantages car elle est plus petite que la protéine de

fusion (50 kD au lieu de 100 kD, environ), et semble pouvoir se lier à deux sous-unités du TNF-α, gardant ainsi une affinité élevée pour celui-ci.
Les résultat obtenus *ex vivo*, à l'aide de lysats de muscles électrotransférés, mettaient en évidence la capacité du muscle squelettique à produire des protéines hTNFR-Is bioactives. Ceci suggère une glycosylation normale par les fibres musculaires.

L'activité biologique du hTNFR-Is produit par les fibroblastes de la lignée stable DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 mettait aussi en évidence la fonctionnalité de la protéine transgénique ainsi exprimée. Cette bioactivité n'a pas été évaluée "avec précision" à l'aide d'un contrôle positif comme la protéine recombinante etanercept, qui nous aurait permis d'obtenir une équivalence entre un nombre de cellules de la lignée et une quantité de protéine recombinante ; nous souhaitions en effet simplement contrôler la capacité de liaison au TNF, de manière qualitative.
L'obtention de protéines biologiquement actives n'a pas été contrôlée par les approches locales (intra-articulaire et intra-oculaire) développées.

II.2. Expression après électrotransfert intramusculaire

Nos résultats mettent en évidence des profils cinétiques différents dans les muscles électrotransférés par les trois variants de hTNFR-Is. La concentration intramusculaire de hTNFR-Is était nettement plus élevée et plus stable pour la protéine de fusion, tandis qu'elle chutait d'un ordre de grandeur entre 7 et 15 jours après électrotransfert pour les formes monomérique et dimérique. La cause de cette décroissance d'expression locale dans les premières semaines après électrotransfert intramusculaire n'est pas complètement expliquée, mais a déjà été observée, y compris chez des souris immunodéficiences SCID[322,355,412]. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. Tout d'abord, le profil de sécrétion des protéines peut être différent de part la variation de taille entre les trois variants, conduisant à un passage différent de la barrière endothéliale. Ainsi, la protéine de fusion, qui est la plus grosse (M≈100 kD) doit rester plus longtemps dans l'espace interstitiel avant de franchir la barrière endothéliale[413], ceci peut expliquer son accumulation dans le muscle jusqu'à 40 jours après électrotransfert. Les protéases intramusculaires pourraient aussi agir différemment selon la taille de la protéine, et dégrader plus difficilement la protéine chimérique, qui est la plus grosse[414]. L'hypothèse d'extinction de gène peut être écartée car une expression à long terme (supérieure à 270 jours) a déjà été observée après électrotransfert d'un plasmide de squelette identique à celui que nous avons utilisé (pCOR) codant la luciférase[309]. De même la phosphatase alcaline sécrétée humaine était aussi détectée jusqu'à 168 jours chez des souris SCID[346]. Une partie des fibres transfectées peut être dégradée suite à une inflammation résultant de l'électrotransfert[331] ou à une réponse immune contre les cellules transfectées. Cependant, une partie au moins des cellules transfectées reste fonctionnelle puisqu'on détecte dans le muscle environ 10% du maximum des protéines monomérique ou dimérique 6 mois après électrotransfert, le niveau détecté étant nettement supérieur au bruit de fond. L'hypothèse d'une réponse immune contre l'ADN plasmidique peut elle aussi être écartée car dans ce cas, nous observerions un profil de chute d'expression similaire pour la protéine chimérique, ce qui n'est pas le cas. De plus, le plasmide utilisé était de squelette pCOR[363], il contient très peu de séquences bactériennes est a été construit spécifiquement pour éviter ce type de réaction immune.

Nous avons évalué la possibilité d'une réaction immune contre les formes monomérique, dimérique ou protéine de fusion pour expliquer les profils cinétiques observés, à l'aide d'un dosage ELISA spécifique des anticorps Ig anti hTNFR-Is ; cependant, aucun anticorps n'a été détecté dans le sérum de souris traitées un mois avant les prélèvements par électrotransfert de 15µg de l'un des trois plasmides. Ces résultats sont en accord, pour la protéine de fusion, avec les résultats de l'étude de

Kolls *et al*[367] qui montraient la faible immunogénicité d'une protéine chimérique très proche de celle que nous avons étudiée.

Concernant les taux circulant de récepteur soluble du TNF-α obtenus, seule la protéine chimérique était nettement détectée durant les 6 mois de l'étude, tandis que le monomère n'était détecté que pendant deux semaines. Le dimère était, quant à lui, détecté pendant deux semaines puis de manière assez aléatoire chez la moitié des animaux (9/18), sur les 6 mois de l'étude. L'électrotransfert du plasmide codant la protéine de fusion hTNFR-Is/mIgG1 permettait d'obtenir une concentration sérique stable de protéine thérapeutique dès le troisième mois après électrotransfert (environ 3 ng de hTNFR-Is/mL), la protéine étant détectée chez toutes les souris. La demi-vie de la protéine chimérique, par utilisation d'un vecteur adénoviral, a été estimée à 29 heures[367], tandis que la demi-vie de la protéine recombinante équivalente (lenercept) est d'environ 5 jours suite à une injection par voie intraveineuse. Ainsi, le muscle squelettique est capable de sécréter une protéine de masse moléculaire élevée (M≈100kD), qui à son tour diffuse efficacement à travers la membrane basale laminaire du muscle. La forme monomérique du hTNFR-Is (M≈25kD) est connue comme étant instable, la demi-vie obtenue par injection sous-cutanée d'onercept est de 15 heures[218]. Nos données sont en accord avec cette brève demi-vie de la protéine monomérique qui n'était plus détectée dans la circulation 15 jours après électrotransfert intramusculaire. Nous espérions que la forme dimérique serait plus stable que la forme monomérique, à la fois vis-à-vis de la dégradation par les protéases mais aussi vis-à-vis de la filtration rénale, de part sa masse moléculaire plus importante (M≈50kD). Cependant, si cette protéine était parfois détectée dans la circulation après les 15 premiers jours suivant l'électrotransfert, c'est à des taux nettement inférieurs à ceux obtenus par électrotransfert de plasmide codant la forme fusionnée du hTNFR-Is. Ces résultats mettent en évidence l'existence d'une dégradation de la protéine par des enzymes ou une filtration rénale élevée, l'hypothèse de réponse immune contre la protéine ayant été éliminée par les dosages effectués.

Les études effectuées dans un modèle de traumatisme crânien diffus avec ouverture transitoire de la barrière hémato-encéphalique ont montré la capacité de passage de la barrière cérébrale par les trois formes de protéine hTNFR-Is sécrétées par le muscle tibial cranial. Ce résultat est particulièrement intéressant pour la forme protéine de fusion hTNFR-Is/mIgG1 de masse moléculaire assez élevée, et dont le passage de la BHE dépend du modèle utilisé et du mode d'administration, lors de l'utilisation de protéine recombinante. Ces résultats seront discutés dans la partie III.

II.3. Expression après électrotransfert intra-articulaire

Les expériences d'effet dose et de suivi cinétique effectuées suite à l'électrotransfert intra-articulaire des trois plasmides thérapeutiques apportent des informations complémentaires à l'approche systémique précédente.
Ainsi, les taux locaux (surnageant de l'articulation mise en culture) de production de protéine monomérique et chimérique étaient très proches. De plus, les maxima locaux étaient observés huit jours après électrotransfert. Or dans le muscle squelettique, la protéine chimérique s'accumulait localement pendant un mois et elle était détectée à des taux très supérieurs au monomère. Les taux de protéine dimérique, dans toutes les expériences réalisées, étaient étonnamment faibles ; nous nous sommes donc assurés de la qualité de la préparation de plasmide, avons contrôlé la séquence plasmidique et vérifié l'expression du transgène *in vitro* par transfection cellulaire ; tous ces contrôles étaient positifs. Les cellules transfectées dans l'articulation ne parviennent peut-être pas à produire ou sécréter cette protéine dimérique, ou celle-ci est produite avec un arrangement spatial différent ce qui

empêche sa détection par notre dosage ELISA. La présence d'anticorps contre la protéine dimérique peut être écartée, les dosages ELISA réalisés n'en ayant pas mis en évidence. Il serait particulièrement intéressant d'effectuer un test d'activité biologique sur cellules L929 avec des surnageants d'articulation transfectées par le plasmide pVAX2 (hTNFR-Is)2.
L'expression sérique obtenue était plus élevée pour la protéine chimérique que pour la forme monomérique, malgré des taux locaux très proches. Ces résultats sont en accord avec la faible stabilité systémique du monomère, et au contraire la bonne stabilité de la protéine de fusion. Les maxima sériques étaient obtenus huit jours après électrotransfert.

Plusieurs hypothèses peuvent permettre d'expliquer les différences d'expression obtenues. Nous pouvons supposer que, contrairement au phénomène observé dans le muscle, la protéine hTNFR-Is/mIgG1 ne s'accumule pas dans l'articulation mais passe beaucoup plus rapidement dans la circulation, ce qui paraît pertinent étant donné l'absence de membrane basale dans l'articulation. Par ailleurs, les cellules transfectées dans l'articulation produisent peut-être moins efficacement une grosse protéine que les cellules musculaires. L'équilibre production-dégradation de protéine est alors atteint plus rapidement. Concernant la protéine chimérique, une réponse immune contre le transgène était observée. En effet, nous avons mis en évidence une production importante d'anticorps dirigés contre le hTNFR-Is ; cependant, ces anticorps n'étaient pas détectés huit jours après électrotransfert (0 souris sur 3), mais seulement dix et quatorze jours après électrotransfert avec le plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 (6 souris sur 6). Ils ne peuvent donc pas expliquer la décroissance d'expression observée dès 8 jours après électrotransfert. Une autre hypothèse, en accord avec les profils de décroissance observés en l'absence de réponse immune pour le monomère et le dimère est la perte d'expression par renouvellement des cellules transfectées.

La différence de réponse immune observée est aussi intéressante. L'absence d'anticorps contre le dimère peut s'expliquer par la faible production de cette protéine dans l'articulation. Par contre le monomère et la protéine de fusion sont produits à des taux voisins. Ainsi, même si le récepteur soluble utilisé est humain (71% d'homologie en acides aminés entre les séquences humaine et murine pour le domaine extracellulaire[415]), il n'induit pas de réponse immune spécifique ; en revanche l'arrangement en protéine de fusion, même si le fragment d'immunoglobuline utilisé est murin, induit une forte réponse immune.
Cependant, dans le cadre d'une utilisation thérapeutique, il serait intéressant de contrôler si les anticorps dirigés contre le hTNFR-Is sont neutralisants. En effet, des anticorps ont été mis en évidence contre une protéine TNFR-Is/IgG1, mais ceux-ci n'étaient pas neutralisants[416]. De même, des anticorps non neutralisant contre la protéine etanercept, couramment utilisée comme traitement de la PR, ont été mis en évidence[417].

Les données concernant l'approche systémique (électrotransfert intramusculaire) mettaient en évidence l'intérêt de la protéine chimérique, produite à des taux plus élevés et plus stables dans la circulation, pour une application thérapeutique. Les résultats obtenus par électrotransfert intra-articulaire suggèrent quant à eux la potentialité de la forme monomérique qui est produite localement à des taux élevés et n'induit pas de réponse immune. Elle est aussi détectée à des taux plus faibles dans la circulation, où elle est rapidement éliminée, ceci est intéressant pour éviter tout effet secondaire indésirable dû à la présence d'anti-TNF dans la circulation (même si les taux sériques obtenus par cette approche restent faibles comparés aux quantités de protéines recombinantes injectées). Cependant, l'affinité plus faible du monomère envers le TNF-α et la nécessité de deux molécules de monomère pour inhiber l'activité biologique d'une molécule de TNF-α pourraient être un obstacle à l'obtention d'un effet thérapeutique intéressant.

Le plasmide codant la protéine chimérique doit quant à lui être utilisé à des doses inférieures à 40µg par articulation, dose qui induit une forte réponse immune contre la protéine transgénique. En effet, nous avons montré qu'à la dose de 20µg par articulation, la réponse immune reste limitée (une souris sur trois, deux jours et huit jours après le second électrotransfert). La réinjection de cette même dose de plasmide permet alors de réinduire l'expression de protéine transgénique, et donc potentiellement d'obtenir un effet thérapeutique à plus long terme. L'utilisation de cette forme permet en outre de conserver le bénéfice d'une forme de récepteur soluble plus affine envers le TNF-α.

III. Potentialité thérapeutique des variants du hTNFR-Is étudiés

III.1. Modèle de traumatisme cérébral

Le rôle du TNF-α dans le traumatisme crânien est toujours débattu, et sujet d'études. Le TNF-α est produit localement suite au traumatisme par les cellules de la microglie (macrophages résidents) et les cellules de l'endothélium microvasculaire[418], et peut-être de manière systémique. Cependant, dans notre modèle, la source majeure de production de TNF, qui contribue à l'accumulation locale et sérique de la protéine reste mal connue. Par ailleurs, il a été montré que le TNF-α peut avoir un rôle néfaste ou protecteur, selon le type de traumatisme et la phase durant laquelle il est exprimé (Sohami *et al*[382] et introduction).
Des protéines identiques ou proches des trois variants de hTNFR-Is ont été étudiées, mais aucune comparaison, dans un modèle unique et par une voie d'administration commune, n'a été réalisée. Nous avons donc voulu étudier la potentialité d'une approche systémique dans le traumatisme crânien et la capacité de passage de la BHE lors du traumatisme par les différentes formes de hTNFR-Is, à l'aide d'une méthode simple, l'électrotransfert intramusculaire. Cette approche repose sur l'hypothèse, vérifiée dans notre modèle[381], d'une ouverture de la BHE transitoire suite au traumatisme. L'intérêt de notre approche est de disposer d'un "réservoir" de protéine thérapeutique disponible au moment de l'ouverture de la BHE, et donc de ne pas nous préoccuper de la fenêtre thérapeutique pour une administration de protéine recombinante efficace dans le cerveau.
L'utilisation de la forme fusionnée hTNFR-Is/mIgG1, de part sa stabilité, pourrait permettre une protection contre les lésions ischémiques secondaires, complication assez courante du traumatisme crânien.
Cette approche par thérapie génique, permettant une production de protéine à long terme, pourrait aussi s'avérer intéressante, si une réouverture de la BHE permet à nouveau le passage des protéines thérapeutiques dans le cerveau, pour lutter contre les lésions ischémiques secondaires ou contre les lésions axonales diffuses pouvant être observées à long terme suite au traumatisme crânien. Le modèle que nous avons utilisé est d'ailleurs très intéressant dans ce contexte, car il met en évidence les lésions axonales diffuses[419], et nous permettrait donc cette étude.

Nous avons tout d'abord contrôlé l'importance du TNF-α et son profil cinétique dans notre modèle de traumatisme crânien modéré et diffus. Notre étude mettait en évidence une détection de TNF-α élevée dans le cerveau, maximale dès une heure après le traumatisme, mais encore importante 48 heures après l'induction du traumatisme. Les taux de TNF-α étaient légèrement plus faibles dans l'hémisphère controlatéral, mais restaient élevés, ce qui confirme bien le caractère diffus du modèle employé. Le TNF-α était aussi détecté dans la circulation à des taux élevés ; le maximum était atteint 3 heures après le traumatisme, mais restait nettement détectable à 48 heures.
Le modèle utilisé se caractérise par une ouverture de la barrière hémato-encéphalique pendant environ 6 heures après le traumatisme[381]. La demi-vie sérique du TNF-α étant inférieure à une heure[420], le taux sérique observé 24 et 48 heures après le traumatisme ne peut s'expliquer que par une production systémique de TNF-α. De même, si on considère que la BHE se referme rapidement après le trauma, la détection à 24 et 48 heures de TNF-α local est liée à une production locale de TNF-α. Ces résultats sont en accord avec des données récentes obtenues dans ce modèle (non publiées) qui mettent en évidence l'activation des cellules de la microglie 24 et 48 heures après induction du traumatisme.

Le profil cinétique de TNF-α observé est variable selon le modèle utilisé. Ainsi, l'équipe de Shohami, dans un modèle proche du notre chez le rat[421], a mis en évidence une expression de TNF-α détectable dès 1 heure et maximale 4 heures après le trauma, à des taux trois fois supérieurs aux notres, puis un retour au niveau basal dès 12 heures. De plus, des taux très faibles étaient détectés dans l'hémisphère controlatéral. Par contre, dans un modèle par percussion de fluide chez le rat, Taupin *et al* ont observé une expression de TNF-α identique dans la zone traumatisée et controlatérale, maximale entre 3 et 8 heures, et nulle à 18 heures[422]. Dans ce même modèle, l'équipe de Knoblach[83] a mis en évidence une expression biphasique de TNF-α dans le cortex traumatisé avec un maximum 1 à 4 heures après le trauma, puis à 72 heures. Dans cette étude, les cellules locales productrices de TNF-α, étudiées par immunohistochimie, étaient principalement des neurones, et non des macrophages résidents.
Ces résultats très variables illustrent l'importance de bien établir le profil de TNF-α dans notre modèle, et les taux élevés détectés confirment le rationnel d'une approche anti-TNF.

Le traitement par électrotransfert était effectué en préventif, afin d'obtenir un maximum de sécrétion protéique au moment du traumatisme cérébral. Nous n'avons pas obtenu d'effet bénéfique sur la récupération des fonctions motrices des animaux à l'aide du traitement par électrotransfert de 50µg de plasmide codant les trois variants du hTNFR-Is. Dans une seconde expérience, seule la protéine de fusion a été étudiée à l'aide d'autres paramètres, mais aucun effet protecteur n'a pu être observé sur la perte de masse, la chute de température, ou l'œdème cérébral.
L'hypothermie reste en effet, à l'heure actuelle, le principal mode de protection des personnes traumatisées[87] ; l'utilisation d'anti-TNF-α pourrait donc se révéler intéressante au niveau thérapeutique non seulement par un effet anti-inflammatoire, mais aussi par un effet hypothermique protecteur.
L'œdème cérébral a quant à lui deux causes principales dans ce modèle de traumatisme. On observe ainsi un œdème vasogénique lié à la rupture de la BHE, et un œdème cytotoxique, qui accompagne la nécrose cellulaire. Le TNF-α contribuant de manière importante à l'ouverture de la BHE[423] et à l'apoptose cellulaire, nous pouvions espérer un effet protecteur sur ce paramètre.
Cependant, concernant l'évaluation thérapeutique des récepteurs solubles du TNF-α dans ce modèle de trauma, nos études restent préliminaires. Ainsi, les taux circulants de hTNFR-Is obtenus (environ 15 ng hTNFR-Is/mL pour la forme chimérique une semaine après électrotransfert de 50µg de plasmide) restent faibles comparés aux doses de protéines injectées dans ce type de modèle. Par exemple, dans un modèle par percussion de fluide chez le rat, 37,5µg de hTNFR-IIs/hIgG1 étaient injectés en intracérébroventriculaire 15 minutes puis une heure après induction du traumatisme[83], un dimère pegylé de hTNFR-Is était quant à lui efficace par injection intracrânienne de 3mg/kg dans un modèle d'ischémie chez la souris[84].

Nos études permettent cependant de mettre en évidence, de manière statistiquement significative, la présence de la forme chimérique hTNFR-Is/mIgG1 dans l'hémisphère traumatisé et la zone controlatérale. Les deux autres formes de récepteur soluble n'étaient pas nettement détectées, cependant, celles-ci étant plus petites, elles devraient être capables de franchir la BHE. Afin de contrôler si le récepteur soluble du TNF-α reste dans la microvasculature cérébrale ou est capable de sortir de la vasculature pour exercer son action inhibitrice, nous avons évalué le taux de hTNFR-Is chez des animaux perfusés. Le taux de protéine de fusion ainsi obtenu dans les carottes cérébrales était nettement plus faible, ce qui met en évidence une localisation principalement vasculaire de la protéine chimérique, mais cette expression était significativement différente des contrôles dans la zone du traumatisme, qui est la plus vascularisée, et donc celle où l'apport de hTNFR-Is était le plus élevé.

Nous avons aussi évalué les taux cérébraux de TNF-α. Chez les animaux non perfusés, nous avons observé une nette tendance d'inhibition du TNF-α dans la zone traumatisée et la zone controlatérale. Les taux de TNF-α détectés étaient plus élevés dans la zone controlatérale qui est *a priori* moins hémorragique ; la circulation du TNF-α y était ainsi moins rapide, et celui-ci s'y accumulait. Cette observation peut aussi être vérifiée sur les taux de hTNFR-Is détectés. De même, l'étude réalisée sur des prélèvements d'animaux perfusés mettait en évidence des taux comparables de TNF-α dans la zone du traumatisme et la région de contrecoup. Dans cette étude, le TNF-α était inhibé d'environ 60% à l'aide du traitement par électrotransfert du plasmide codant la protéine chimérique. Cette inhibition locale est intéressante, même si elle ne permet pas d'observer des effets notables sur les paramètres thérapeutiques d'évaluation du traumatisme. Nous ne pouvons toutefois pas savoir si cette observation résulte d'une inhibition locale directe du TNF-α (formation des complexes TNF-TNFRs dans le parenchyme cérébral), ou si elle est liée à l'inhibition du TNF-α circulant.
En effet, nous avons observé une inhibition significative du taux de TNF-α sérique 24 heures après l'induction du traumatisme à l'aide des protéines dimérique et chimérique. Ces résultats confirment en outre l'existence d'une inflammation systémique parallèle à l'inflammation locale crée par le traumatisme.

Il pourrait ainsi être intéressant d'utiliser des protéines marquées (radiomarquage ou marquage fluorescent) pour mieux comprendre le trafic des protéines, et vérifier les cinétiques de passage de la BHE. Dans ce cadre, l'utilisation de récepteur soluble du TNF-α fusionné à une protéine fluorescente, au sein même du plasmide électrotransféré, est envisageable, et pourrait être étudiée par imagerie optique CCD.

Des études ont pourtant été réalisées avec succès à l'aide d'inhibiteurs du TNF-α. Ainsi, Shohami *et al*[85] ont efficacement réduit l'œdème cérébral et amélioré la récupération motrice d'animaux traumatisés, par une injection intraveineuse de 200µg de récepteur soluble du TNF-α monomérique dans les cinq minutes suivant le trauma. Cette administration d'anti-TNF permettait de réduire la durée d'ouverture de la BHE aux quatre premières heures suivant le traumatisme, comparativement aux animaux contrôles. Or, il a été montré que cette protéine passe très peu la BHE[424]. Il suffisait donc d'inhiber le TNF-α durant les premières heures suivant le traumatisme, lorsque la BHE est ouverte pour obtenir un effet thérapeutique intéressant à long terme, durant au moins 14 jours. Cette inhibition précoce du TNF peut donc induire des modifications sur des médiateurs en aval qui permettent cet effet bénéfique. Ce blocage uniquement précoce du TNF-α est en fait très intéressant puisque les effets protecteurs du TNF-α à long terme ont été rapportés[382]. Par ailleurs, dans un modèle par percussion de fluide, un inhibiteur chimérique hTNFR-IIs/hIgG1 permettait une récupération des fonctions motrices lorsqu'il était administré par voie intracérébroventriculaire, mais non par voie intraveineuse. L'hypothèse de cet échec est la taille élevée de la protéine qui ne passerait pas la BHE, même lors du traumatisme. Enfin, l'utilisation d'une forme dimérique pegylée de TNFR-Is dans un modèle d'ischémie permettait de réduire le volume de lésion, paramètre quantifiable pour un tel modèle localisé, de 26% par injection locale, de 20% par voie intraveineuse, et de 15% par injection intrapéritonéale[425].
Des inhibiteurs chimiques du TNF-α ont aussi été utilisés pour inhiber l'inflammation intracérébrale et ses effets délétères : pentoxifylline[85] ou un inhibiteur des MAP kinases[426]. Une importante expression d'IL-1 est aussi mise en évidence localement suite à un traumatisme, et des effets similaires au TNF-α lui ont été attribués. Des traitements efficaces à l'aide d'anticorps anti IL-1 ou d'antagoniste du récepteur de l'IL-1 ont été rapportés[427].

La protéine transgénique hTNFR-Is/mIgG1 est donc capable de passer la BHE après induction du traumatisme crânien, et de quitter la circulation pour atteindre les zones inflammatoires locales. Cependant, pour les trois variants, les taux protéiques circulants obtenus sont très inférieurs aux quantités de protéine recombinante ayant permis un effet bénéfique sur l'évolution du traumatisme ; ils ne permettent peut-être pas d'inhiber suffisamment l'inflammation. De plus, les paramètres que nous avons évalués (score neurologique, œdème cérébral, masse pondérale) ne sont pas très sensibles. Ces résultats sont en outre préliminaires. Pour obtenir des résultats plus sensibles et peut-être parvenir à un effet par traitement avec les récepteurs solubles du TNF-α sur des médiateurs en aval du TNF, nous souhaitons effectuer des études de RT-PCR en temps réel.

III.2. Modèle d'uvéite expérimentale aux endotoxines

Afin de valider la potentialité d'une approche par électrotransfert du muscle ciliaire, permettant la sécrétion locale de protéine dans l'humeur aqueuse, nous nous sommes intéressés au modèle d'uvéite expérimentale aux endotoxines chez le rat. Ce modèle nous permettait de tester un plasmide codant le récepteur soluble du TNF-α ; nous avons choisi la forme fusionnée hTNFR-Is/mIgG1 qui s'est révélée très efficace par électrotransfert dans le muscle tibial cranial du plasmide correspondant dans le modèle expérimental d'arthrite. De plus, des études utilisant l'etanercept ou une protéine TNFR-Is/IgG1 sont en cours chez l'homme, et les résultats sont encourageants (voir introduction).

Nos résultats mettent en évidence une nette inhibition des scores cliniques et de l'infiltration cellulaire par injection seule de 30µg de plasmide codant la protéine chimérique. Cette protection était encore améliorée par injection suivie d'électrotransfert de la même dose de plasmide. A la dose de 3µg de plasmide, l'injection seule de plasmide thérapeutique ne permettait pas l'inhibition de l'uvéite ; en revanche, lorsque l'injection de 3µg de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 était suivie d'un électrotransfert, les signes cliniques et l'infiltration de cellules inflammatoires étaient très significativement inhibés.
Suite à l'électrotransfert de ces deux doses de plasmide, aucun récepteur soluble n'était détecté dans la circulation une semaine après électrotransfert, chez des animaux sains ou malades.

Des études de thérapie génique ont permis de prévenir le développement d'une d'uvéite expérimentale auto-immune par injection rétro-orbitale d'un adénovirus codant l'IL-10virale[428] ou par injection intravitréenne de cellules gliales de Müller préalablement infectées par ce même adénovirus[429].
Dans le modèle d'uvéite expérimentale aux endotoxines que nous avons utilisé, l'injection sous-cutanée de 60µg d'etanercept permettait de réduire les scores cliniques et l'infiltration de cellules inflammatoires[430], ainsi que l'apoptose et la perméabilité vasculaire[117]. De même, l'injection intrapéritonéale de deux fois 1 ou 2 mg de protéine hTNFR-Is/hIgG1 dans un modèle d'uvéite auto-immune, ne réduisait pas le nombre de macrophages infiltrés, mais permettait d'inhiber leur production de NO• et le dommage cellulaire de photorécepteurs[118]. Cette même protéine fusionnée est administrée chez l'homme par voie intraveineuse à la dose de 50mg afin de traiter efficacement des patients atteints d'inflammation du segment oculaire postérieur[119]. Les doses de protéine recombinante nécessaires pour le traitement des uvéites sont donc très élevées.

Dans notre étude, nous avons obtenu un effet thérapeutique avec des taux locaux de récepteur soluble du TNF-α d'environ 100pg/mL, sans parvenir à détecter la protéine dans la circulation. Cette approche semble donc très intéressante pour éviter les effets indésirables de forts taux systémiques de protéine recombinante.

Le rationnel de l'électrotransfert du muscle ciliaire peut être discuté étant donné l'efficacité du traitement par injection seule de 30µg de plasmide dans le muscle ciliaire. Cependant, la présence de motifs CpG immunostimulants présents sur les plasmides utilisés actuellement conduit à favoriser un traitement par une quantité minimale de plasmide. De plus, l'électrotransfert permet de réduire de manière importante la variabilité interindividuelle d'expression du transgène, ce qui est net pour l'analyse histologique des expériences effectuées par injection de 3µg de plasmide, avec et sans électrotransfert. Or la reproductibilité du traitement est un critère très important pour une possible application chez l'homme.

III.3. Modèle d'arthrite expérimentale au collagène

III.3.1 *Approches systémiques*

Notre première approche s'est fondée sur l'utilisation de l'électrotransfert intramusculaire afin d'obtenir la sécrétion de la protéine thérapeutique, et son action systémique sur les articulations touchées par la maladie. Cette approche avait déjà été utilisée avec succès au laboratoire à l'aide d'un plasmide codant l'IL-10[354]. Une première expérience réalisée à la dose de 15µg de plasmide thérapeutique a mis en évidence l'intérêt de l'électrotransfert puisqu'une simple injection du plasmide pCOR hTNFR-Is/mIgG1 ne permettait pas d'inhiber les signes cliniques de la maladie.
Les résultats obtenus par électrotransfert de 50µg de plasmide codant la protéine chimérique hTNFR-Is/mIgG1 montrent qu'un unique traitement, à l'apparition des signes cliniques de la maladie, permettait d'obtenir une inhibition très nette des signes cliniques et histologiques dans un modèle expérimental de polyarthrite rhumatoïde. L'effet protecteur était observé à long terme sur plus de cinq semaines.
L'électrotransfert de la même dose de plasmide codant la forme dimérique de hTNFR-Is permettait une inhibition modérée, mais néanmoins statistiquement significative, des signes cliniques de la maladie, mais était sans effet sur les signes histologiques. La légère décroissance des scores cliniques était observée à partir de deux à trois semaines après électrotransfert ; or à cette date, les taux sériques de protéine dimérique avaient chuté. Des études réalisées avec des splénocytes infectés par un rétrovirus codant pour le monomère TNFR-Is, ont mis en évidence que l'évolution de la maladie ne corrélait pas avec le taux sérique de protéine, mais avec le taux local articulaire[389,390]. Ceci pourrait expliquer l'effet thérapeutique du dimère malgré son faible taux sérique. Nous pouvons par ailleurs supposer que l'utilisation d'une dose plus élevée de plasmide permettrait une meilleure prévention du développement de la maladie.
La forme monomérique ne permettait pas quant à elle d'inhiber la progression de l'arthrite, ceci peut s'expliquer par son instabilité sérique, et sa faible affinité envers le TNF-α. Des taux très élevés de protéine circulante sont donc nécessaires pour obtenir un effet thérapeutique. Ainsi, les essais de phase clinique I réalisés avec la protéine recombinante onercept se basent sur une dose de 50 mg de protéine injectée par voie sous-cutanée tous les deux jours, et l'efficacité thérapeutique de cette dose n'a pas encore été contrôlée.

Diverses approches de thérapie génique systémique ont été utilisées dans des modèles animaux de PR, tels que l'arthrite expérimentale au collagène chez la souris, les souris transgéniques pour le

TNF-α, l'arthrite induite par des parois de streptocoques chez le rat, ou encore l'arthrite induite par des antigènes chez le lapin. Ces études montraient qu'il est possible de traiter l'inflammation articulaire par transfert du gène du TNFRs. Ainsi, un vecteur adénoviral codant la protéine de fusion TNFR-Is/mIgG1 injecté lors de l'apparition des signes cliniques chez la souris permettait une amélioration de l'AEC pendant 10 jours, mais une forte augmentation des scores arthritiques était observée les 10 jours suivants, tandis que la protéine était toujours détectée dans le sérum. La même observation a été effectuée par cette équipe après administration d'une protéine recombinante TNFR-Is/IgG1[368]. L'hypothèse émise pour expliquer cette efficacité uniquement à court terme est l'obtention d'une réponse immune contre la protéine transgénique, entraînant la production d'anticorps anti-TNFR-Is qui exerceraient un effet agoniste au TNF-α en se liant aux récepteurs membranaires. D'autres travaux, utilisant une construction adénovirale similaire, mais dans l'arthrite au collagène chez le rat, ont montré l'efficacité de la protéine obtenue par injection intraveineuse de l'adénovirus avant ou après le début de la maladie, mais cette équipe n'a observé aucun effet thérapeutique par injection intra-articulaire[431].
Simultanément à nos travaux, deux équipes ont étudié l'efficacité d'approches anti-TNF-α par électrotransfert intramusculaire. Kim *et al*[355] ont ainsi montré l'efficacité, pendant au moins 18 jours, d'un plasmide codant une protéine fusionnée hTNFR-IIs/hIgG1et administré par électrotransfert à l'apparition des signes cliniques de la maladie, sur les scores cliniques et histologiques de l'arthrite expérimentale au collagène. Le traitement par électrotransfert d'un plasmide codant une forme dimérique du hTNFR-IIs avec un espaceur polyglycine permettait une légère inhibition des signes cliniques de la maladie sur treize jours[385], sans que la protéine ne soit détectée dans le sérum. Ces résultats sont en accord avec nos observations, et confirment la supériorité de la forme fusionnée du récepteur soluble du TNF-α pour le traitement de la PR par approche systémique.

Nous avons réalisé un contrôle positif de l'inhibition du développement de la maladie par injections répétées de protéine recombinante etanercept. Lorsque les injections étaient réalisées trois fois par semaine, à la dose de 200µg, les animaux étaient très efficacement protégés de la maladie ; par contre, les scores cliniques augmentaient dès que les injections étaient espacées (deux/semaine). L'arrêt complet des injections entraînait une rapide augmentation des scores cliniques des animaux ; ils devenaient supérieurs à ceux observés par un unique électrotransfert de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 cinq semaines auparavant. Ces résultats sont en accord avec les observations réalisées chez des patients atteints de PR placés sous traitement par etanercept, chez qui l'arrêt du traitement conduit au retour immédiat des symptômes de la maladie[432].
Par ailleurs, l'observation de scores cliniques stables mais plus élevés chez les animaux électrotransférés par le plasmide codant la forme chimérique hTNFR-Is/mIgG1, comparés à ceux traités par etanercept, est sans doute liée au délai nécessaire entre l'électrotransfert et l'obtention, dans la circulation, d'un taux suffisant de protéine thérapeutique. En effet, les résultats obtenus par l'étude cinétique montrent que deux semaines sont nécessaires pour atteindre le taux maximal de protéine sécrétée. Les scores cliniques se stabilisent dès six jours après électrotransfert, ce qui suggère que le taux de protéine chimérique permettant d'inhiber la progression de la maladie est atteint en quelques jours (≈5ng/mL). Ce taux correspond à la valeur stable de protéine obtenue à long terme, ce qui peut laisser supposer un effet thérapeutique possible à très long terme par cette approche.

Les résultats obtenus illustrent la potentialité d'une approche par thérapie génique systémique pour le traitement de la PR. Cette approche permet une sécrétion continue et à long terme de la protéine à un taux thérapeutique. Par cette méthode, les taux circulants de protéine thérapeutique sont d'environ 5 à 10 ng/mL chez la souris, valeurs nettement inférieures aux 200µg d'etanercept utilisés en injections

bihebdomadaires. Ces faibles taux circulant devraient donc garantir l'absence de tout effet secondaire systémique.

L'utilisation de la lignée cellulaire DBA/Tst/hTNFR-Is/mIgG1 dans le modèle de l'arthrite expérimentale au collagène n'a pu être réalisée pour des raisons de temps. Cependant, les temps circulants de protéine transgénique étaient encore de l'ordre de 1ng/mL trois semaines après la greffe de 8.10^6 cellules, ce qui s'est avéré être un taux circulant efficace par électrotransfert du plasmide codant la forme fusionnée hTNFR-Is/mIgG1 dans le même modèle de pathologie. Cette étude a donc toutes les chances de donner des résultats intéressants.

III.3.2 *Approche locale*

Les caractéristiques d'expression obtenues par électrotransfert intra-articulaire des plasmides codant les formes chimérique et monomérique du récepteur soluble du TNF-α mettent en évidence des taux locaux assez élevés de protéine transgénique, qui devraient permettre un effet protecteur dans le modèle de l'arthrite expérimentale au collagène. Une étude préliminaire a été effectuée afin de déterminer la dose de plasmide à administrer aux animaux. En comparant l'expression obtenue suite à deux électrotransferts à treize jours d'intervalle (lorsque le taux de protéine est quasiment retombé au niveau basal) de 20 µg ou 40 µg par articulation de plasmide pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1, nous avons montré qu'il était possible de réinduire l'expression de hTNFR-Is à des taux élevés uniquement avec la dose de 20 µg de plasmide. L'expression de récepteur soluble obtenue par électrotransfert de 20 µg de plasmide étant assez proche de celle obtenue avec 40 µg, la dose de 20 µg de plasmide est donc à privilégier pour évaluer la potentialité des variants du hTNFR-Is dans le modèle de l'AEC. Le traitement sera réalisé à l'apparition des signes cliniques de la maladie, avec un second électrotransfert de la même dose de plasmide une dizaine de jours après le premier, afin de réinduire la production de protéine thérapeutique.

A l'heure actuelle, l'électrotransfert intra-articulaire n'a pas été utilisé dans un cadre thérapeutique, mais semble intéressant dans le traitement de pathologies articulaires telles que la PR et l'arthrose[433]. Par contre, des approches locales de thérapie génique virale ont été utilisées avec succès dans des modèles expérimentaux de PR. Une première approche locale directe (n'impliquant pas le traitement de cellules *ex vivo*) a montré une légère protection sur l'infiltration cellulaire par injection d'un vecteur adénoviral codant une protéine chimérique TNFR-Is/IgG1, mais aucun effet protecteur sur la destruction articulaire[434] ; en revanche, le traitement simultané par cette construction anti-TNF et un adénovirus codant le récepteur soluble de type I de l'IL-1 permettait une nette inhibition de l'infiltration cellulaire et de la destruction du cartilage. Un vecteur AAV codant une forme monomérique TNFR-Is permettait de prévenir le développement des signes cliniques et histologiques de l'arthrite chez des souris transgéniques pour le TNF-α durant deux mois[399]. De même un vecteur AAV codant une protéine chimérique permettait d'inhiber le gonflement, l'inflammation, et l'érosion du cartilage durant la phase chronique de l'arthrite observée dans le modèle induit par des parois de streptocoques[397]. Enfin, l'utilisation d'un vecteur lentiviral codant l'IL-1Ra permettait une infection efficace des synoviocytes de l'articulation de rats, entraînant l'inhibition de l'inflammation induite au préalable par injection locale de fibroblastes modifiés pour exprimer l'IL-1β[398,435].

Dans toutes ces études, un effet thérapeutique a été observé dans l'articulation controlatérale non traitée. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation[24]. Tout d'abord, les cellules transfectées pourraient diffuser dans l'articulation controlatérale, mais cette hypothèse n'a jamais été

vérifiée. La protéine transgénique pourrait diffuser elle-même en quantité suffisante dans l'articulation controlatérale pour y être efficace, cependant la protéine est rarement détectable dans l'articulation controlatérale. Le transfert de gène local pourrait induire une immunosuppression globale dans l'organisme, cependant cette possibilité, lorsqu'elle a été étudiée, n'a pas été vérifiée[436]. L'hypothèse la plus envisageable reste la transfection de cellules présentatrices de l'antigène au sein de l'articulation traitée ; ces cellules peuvent ensuite diffuser vers d'autres sites inflammatoires ou vers des organes lymphoïdes périphériques et réguler la réponse immune. Cet effet controlatéral est très intéressant pour le traitement d'une pathologie comme la PR, dans laquelle de nombreuses articulations peuvent être atteintes. Ainsi, il ne serait pas nécessaire de traiter toutes les articulations, et un effet bénéfique distal serait possible.

CONCLUSION

Les travaux réalisés ont montré la faisabilité d'une stratégie de thérapie génique systémique, par électrotransfert intramusculaire, dans un modèle de maladie auto-immune et inflammatoire comme la polyarthrite rhumatoïde, ainsi que la faisabilité d'une approche locale par électrotransfert du muscle ciliaire dans un modèle de maladie inflammatoire intra-oculaire comme l'uvéite. Cette application de la méthode d'électrotransfert au muscle ciliaire illustre le potentiel de nouvelles cibles pour cette technologie, dont le muscle lisse.

Les approches par thérapie cellulaire et électrotransfert intra-articulaire restent à évaluer dans un modèle expérimental de polyarthrite rhumatoïde car les études préliminaires que nous avons effectuées sont très prometteuses.

Nos résultats confirment aussi le rôle connu du récepteur soluble du TNF-α comme puissant inhibiteur de l'inflammation, et illustrent l'intérêt de l'électrotransfert pour comparer facilement les caractéristiques de différentes formes de récepteur soluble, et leur potentialité thérapeutique.

Si les résultats obtenus sont encourageants, ils ne font qu'ouvrir la voie à de nombreuses études nécessaires avant tout essai de thérapie génique dans les différentes pathologies étudiées, non mortelles à court terme.

Ainsi, dans un contexte de sécurité, une étude clinique a été réalisée chez l'homme afin d'estimer la douleur engendrée par les impulsions électriques lors de l'électrotransfert du quadriceps avec une solution saline ; les dommages musculaires ont aussi été évalués. Les résultats sont très encourageants car la procédure est douloureuse, mais tolérable, et quelques dommages musculaires ont été mis en évidence, mais uniquement à court terme[437].

Parmi les essais cliniques réalisés pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, une protéine fusionnée TNFRs/IgG, proche de celle que nous avons utilisée dans nos études, fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase I, débuté aux Etats-Unis en 2003. Le gène thérapeutique est délivré à l'aide d'un vecteur AAV administré localement dans l'articulation.

Les résultats actuels obtenus en thérapie génique ne répondent pas encore aux attentes placées dans cette méthode (peu d'essais cliniques en phase III et aucun en phase IV, survenue "d'effets indésirables graves"). Cependant, la maîtrise et l'amélioration des vecteurs ainsi que l'identification de gènes cibles appropriés sont en réel progrès. La preuve de l'efficacité de différentes méthodes de thérapie génique a par ailleurs été apportée dans des maladies telles que l'hémophilie, les dystrophies musculaires, ou la mucoviscidose.
Même si les essais cliniques utilisant des vecteurs non viraux restent pour le moment minoritaires (environ 14% en ADN nu et 9% en lipofection), l'évolution actuelle ouvre la voie à un futur prometteur pour la thérapie génique non virale.

BIBLIOGRAPHIE

1 Carswell EA *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; **72:** 3666-3670.
2 Aggarwal BB *et al.* Human tumour necrosis factors: structure and receptor interactions. *Ciba Found Symp* 1987; **131:** 39-51.
3 Pennica D *et al.* Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82:** 6060-6064.
4 Haranaka K *et al.* Purification, characterization, and antitumor activity of nonrecombinant mouse tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83:** 3949-3953.
5 Aggarwal BB, Moffat B, Harkins RN. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem* 1984; **259:** 686-691.
6 Ware CF. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; **14:** 181-184.
7 Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 2002; **27:** 19-26.
8 Nedwin GE *et al.* Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985; **13:** 6361-6373.
9 Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* 1985; **318:** 665-667.
10 Jones EY, Stuart DI, Walker NP. Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 1989; **338:** 225-228.
11 Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 1989; **264:** 17595-17605.
12 Baeyens KJ *et al.* The structure of mouse tumour-necrosis factor at 1.4 A resolution: towards modulation of its selectivity and trimerization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1999; **55 (Pt 4):** 772-778.
13 Eck MJ *et al.* The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-A resolution. *J Biol Chem* 1992; **267:** 2119-2122.
14 Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000; **50:** 184-195.
15 Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; **334:** 1717-1725.
16 Firestein GS, Manning AM. Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1999; **42:** 609-621.
17 Makhatadze NJ. Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications. *Hum Immunol* 1998; **59:** 571-579.
18 Anderson P. Post-transcriptional regulation of tumour necrosis factor alpha production. *Ann Rheum Dis* 2000; **59 Suppl 1:** i3-5.
19 Han J, Brown T, Beutler B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J Exp Med* 1990; **171:** 465-475.
20 Kontoyiannis D *et al.* Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 1999; **10:** 387-398.
21 Winzen R *et al.* The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *Embo J* 1999; **18:** 4969-4980.
22 Gearing AJ *et al.* Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha. *J Leukoc Biol* 1995; **57:** 774-777.
23 Newton RC *et al.* Biology of TACE inhibition. *Ann Rheum Dis* 2001; **60 Suppl 3:** iii25-32.
24 Kandil HM, Argenzio RA, Sartor RB. Low endogenous prostaglandin E2 predisposes to relapsing inflammation in experimental rat enterocolitis. *Dig Dis Sci* 1999; **44:** 2110-2118.
25 Strassmann G *et al.* Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J Exp Med* 1994; **180:** 2365-2370.
26 Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996; **14:** 397-440.
27 Hyka N *et al.* Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood* 2001; **97:** 2381-2389.

28 Smith CA *et al.* A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 1990; **248:** 1019-1023.
29 Schall TJ *et al.* Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 1990; **61:** 361-370.
30 Loetscher H *et al.* Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1990; **61:** 351-359.
31 Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993; **74:** 845-853.
32 Armitage RJ. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 1994; **6:** 407-413.
33 Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95:** 570-575.
34 Banner DW *et al.* Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 1993; **73:** 431-445.
35 Chen PC, DuBois GC, Chen MJ. Mapping the domain(s) critical for the binding of human tumor necrosis factor-alpha to its two receptors. *J Biol Chem* 1995; **270:** 2874-2878.
36 Reed C *et al.* Crystal structure of TNF-alpha mutant R31D with greater affinity for receptor R1 compared with R2. *Protein Eng* 1997; **10:** 1101-1107.
37 Chan FK *et al.* A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000; **288:** 2351-2354.
38 Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; **296:** 1634-1635.
39 Micheau O. [To die or not to die? Towards the understanding of TNF-R1 signaling dichotomy]. *Med Sci (Paris)* 2004; **20:** 153-155.
40 Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001; **11:** 372-377.
41 Li M, Beg AA. Induction of necrotic-like cell death by tumor necrosis factor alpha and caspase inhibitors: novel mechanism for killing virus-infected cells. *J Virol* 2000; **74:** 7470-7477.
42 Nguyen LT *et al.* TRAF2 deficiency results in hyperactivity of certain TNFR1 signals and impairment of CD40-mediated responses. *Immunity* 1999; **11:** 379-389.
43 Lee EG *et al.* Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 2000; **289:** 2350-2354.
44 Engelmann H *et al.* A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J Biol Chem* 1989; **264:** 11974-11980.
45 Seckinger P, Isaaz S, Dayer JM. Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor. *J Biol Chem* 1989; **264:** 11966-11973.
46 Seckinger P, Zhang JH, Hauptmann B, Dayer JM. Characterization of a tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) inhibitor: evidence of immunological cross-reactivity with the TNF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87:** 5188-5192.
47 Cope AP *et al.* Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1992; **35:** 1160-1169.
48 Van Zee KJ *et al.* Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89:** 4845-4849.
49 Aderka D *et al.* Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 1992; **175:** 323-329.
50 Gruss HJ, Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 1995; **85:** 3378-3404.
51 Wride MA, Sanders EJ. Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat Embryol (Berl)* 1995; **191:** 1-10.
52 Krueger JM *et al.* Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 1998; **856:** 148-159.
53 Beutler BA. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol Suppl* 1999; **57:** 16-21.
54 Bertolini DR *et al.* Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986; **319:** 516-518.

55 Iademarco MF, Barks JL, Dean DC. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF-alpha in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; **95:** 264-271.

56 Weller A, Isenmann S, Vestweber D. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 1992; **267:** 15176-15183.

57 Rathanaswami P *et al.* Synergistic effect of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha on interleukin-8 gene expression in synovial fibroblasts. Evidence that interleukin-8 is the major neutrophil-activating chemokine released in response to monokine activation. *Arthritis Rheum* 1993; **36:** 1295-1304.

58 Hachicha M, Rathanaswami P, Schall TJ, McColl SR. Production of monocyte chemotactic protein-1 in human type B synoviocytes. Synergistic effect of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma. *Arthritis Rheum* 1993; **36:** 26-34.

59 Sakurai H *et al.* Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 1995; **96:** 2357-2363.

60 Jasser MZ, Mitchell PG, Cheung HS. Induction of stromelysin-1 and collagenase synthesis in fibrochondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *Matrix Biol* 1994; **14:** 241-249.

61 Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; **162:** 2163-2168.

62 Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996; **77:** 110-117.

63 Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; **348:** 138-150.

64 Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. *Lancet* 1998; **351:** 1501-1505.

65 Dinarello CA. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; **216:** 133-165.

66 Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; **2:** 675-680.

67 Waage A, Halstensen A, Espevik T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* 1987; **1:** 355-357.

68 Tracey KJ *et al.* Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; **234:** 470-474.

69 Tracey KJ *et al.* Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987; **330:** 662-664.

70 Pfeffer K *et al.* Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* 1993; **73:** 457-467.

71 Schumann J *et al.* Acute hepatotoxicity of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A in mice depends on T cells and TNF. *J Immunol* 1998; **161:** 5745-5754.

72 Warren HS. Strategies for the treatment of sepsis. *N Engl J Med* 1997; **336:** 952-953.

73 Zeni F, Freeman B, Natanson C. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit Care Med* 1997; **25:** 1095-1100.

74 Fisher CJ, Jr. *et al.* Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996; **334:** 1697-1702.

75 Echtenacher B, Hultner L, Mannel DN. Cellular and molecular mechanisms of TNF protection in septic peritonitis. *J Inflamm* 1995; **47:** 85-89.

76 Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003; **9:** 517-524.

77 Masson F. [Epidemiology of severe cranial injuries]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2000; **19:** 261-269.

78 Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; **24:** 133-150.

79 Prasad K. The Glasgow Coma Scale: a critical appraisal of its clinimetric properties. *J Clin Epidemiol* 1996; **49:** 755-763.

80 Gennarelli TA, Graham DI. Neuropathology of the Head Injuries. *Semin Clin Neuropsychiatry* 1998; **3:** 160-175.

81 Stelmasiak Z, Dudkowska-Konopa A, Rejdak K. Head trauma and neuroprotection. *Med Sci Monit* 2000; **6:** 426-432.

82 de Vries HE *et al.* The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* 1996; **64:** 37-43.

83 Knoblach SM, Fan L, Faden AI. Early neuronal expression of tumor necrosis factor-alpha after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J Neuroimmunol* 1999; **95:** 115-125.

84 Nawashiro H, Martin D, Hallenbeck JM. Neuroprotective effects of TNF binding protein in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1997; **778:** 265-271.

85 Shohami E *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) activity in rat brain is associated with cerebroprotection after closed head injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; **16:** 378-384.

86 Scherbel U *et al.* Evaluation of neurobehavioral deficits in brain injured tumor necrosis factor-deficient (TNF-/-) mice after experimental brain injury. *J Neuotrauma* 1997; **14:** 781.

87 Sahuquillo J, Mena MP, Vilalta A, Poca MA. Moderate hypothermia in the management of severe traumatic brain injury: a good idea proved ineffective? *Curr Pharm Des* 2004; **10:** 2193-2004.

88 Clifton GL. Is keeping cool still hot? An update on hypothermia in brain injury. *Curr Opin Crit Care* 2004; **10:** 116-119.

89 Biegon A. Cannabinoids as neuroprotective agents in traumatic brain injury. *Curr Pharm Des* 2004; **10:** 2177-2183.

90 Laurer HL, McIntosh TK. Experimental models of brain trauma. *Curr Opin Neurol* 1999; **12:** 715-721.

91 Toulmond S *et al.* Biochemical and histological alterations induced by fluid percussion brain injury in the rat. *Brain Res* 1993; **620:** 24-31.

92 Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma* 1988; **5:** 1-15.

93 Smith DH *et al.* A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma* 1995; **12:** 169-178.

94 Dixon CE *et al.* A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 1991; **39:** 253-262.

95 Marmarou A *et al.* A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg* 1994; **80:** 291-300.

96 Hall ED. High-dose glucocorticoid treatment improves neurological recovery in head-injured mice. *J Neurosurg* 1985; **62:** 882-887.

97 Shapira Y *et al.* Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties. *Crit Care Med* 1988; **16:** 258-265.

98 Durrani OM *et al.* Degree, duration, and causes of visual loss in uveitis. *Br J Ophthalmol* 2004; **88:** 1159-1162.

99 Levecq L, Disneur D, Dutrieux C, Snyers B. [Etiologies of intermediate, posterior, and panuveitis: a review of 201 cases]. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 1999; **273:** 9-14.

100 Wildner G, Diedrichs-Mohring M. Autoimmune uveitis and antigenic mimicry of environmental antigens. *Autoimmun Rev* 2004; **3:** 383-387.

101 Foxman EF *et al.* Inflammatory mediators in uveitis: differential induction of cytokines and chemokines in Th1- versus Th2-mediated ocular inflammation. *J Immunol* 2002; **168:** 2483-2492.

102 Planck SR, Huang XN, Robertson JE, Rosenbaum JT. Cytokine mRNA levels in rat ocular tissues after systemic endotoxin treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; **35:** 924-930.

103 Yoshida M *et al.* Interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor gene expression in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; **35:** 1107-1113.

104 de Vos AF, Klaren VN, Kijlstra A. Expression of multiple cytokines and IL-1RA in the uvea and retina during endotoxin-induced uveitis in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; **35:** 3873-3883.

105 Ohta K *et al.* Analysis of immunomodulatory activities of aqueous humor from eyes of mice with experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* 2000; **164:** 1185-1192.

106 Rosenbaum JT, Boney RS. Activity of an interleukin 1 receptor antagonist in rabbit models of uveitis. *Arch Ophthalmol* 1992; **110:** 547-549.

107 Hayashi S *et al.* Interleukin 10 inhibits inflammatory cells infiltration in endotoxin-induced uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; **234:** 633-636.

108 Goureau O *et al.* Increased nitric oxide production in endotoxin-induced uveitis. Reduction of uveitis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Immunol* 1995; **154:** 6518-6523.
109 Di Girolamo N *et al.* Increased matrix metalloproteinases in the aqueous humor of patients and experimental animals with uveitis. *Curr Eye Res* 1996; **15:** 1060-1068.
110 Perez VL *et al.* Elevated levels of interleukin 6 in the vitreous fluid of patients with pars planitis and posterior uveitis: the Massachusetts eye & ear experience and review of previous studies. *Ocul Immunol Inflamm* 2004; **12:** 193-201.
111 de Vos AF *et al.* Kinetics of intraocular tumor necrosis factor and interleukin-6 in endotoxin-induced uveitis in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; **35:** 1100-1106.
112 Dick AD, Forrester JV, Liversidge J, Cope AP. The role of tumour necrosis factor (TNF-alpha) in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Prog Retin Eye Res* 2004; **23:** 617-637.
113 De Vos AF *et al.* Tumour necrosis factor-induced uveitis in the Lewis rat is associated with intraocular interleukin 6 production. *Exp Eye Res* 1995; **60:** 199-207.
114 Smith JR, Hart PH, Coster DJ, Williams KA. Mice deficient in tumor necrosis factor receptors p55 and p75, interleukin-4, or inducible nitric oxide synthase are susceptible to endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; **39:** 658-661.
115 Brito BE *et al.* IL-1 and TNF receptor-deficient mice show decreased inflammation in an immune complex model of uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; **40:** 2583-2589.
116 Fleisher LN, Ferrell JB, McGahan MC. Ocular inflammatory effects of intravitreally injected tumor necrosis factor-alpha and endotoxin. *Inflammation* 1990; **14:** 325-335.
117 Koizumi K *et al.* Contribution of TNF-alpha to leukocyte adhesion, vascular leakage, and apoptotic cell death in endotoxin-induced uveitis in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44:** 2184-2191.
118 Robertson M, Liversidge J, Forrester JV, Dick AD. Neutralizing tumor necrosis factor-alpha activity suppresses activation of infiltrating macrophages in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44:** 3034-3041.
119 Greiner K *et al.* Anti-TNFalpha therapy modulates the phenotype of peripheral blood CD4+ T cells in patients with posterior segment intraocular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45:** 170-176.
120 De Vos AF *et al.* Systemic anti-tumor necrosis factor antibody treatment exacerbates endotoxin-induced uveitis in the rat. *Exp Eye Res* 1995; **61:** 667-675.
121 Rosenbaum JT, Boney RS. Failure to inhibit endotoxin-induced uveitis with antibodies that neutralize tumor necrosis factor. *Reg Immunol* 1993; **5:** 299-303.
122 Behar-Cohen F. Vectorisation intra-oculaire. *Médecine/Sciences* 2004; **20:** 701-706.
123 El-Shabrawi Y, Mangge H, Hermann J. Anti-tumour necrosis factor alpha treatment in chronic recurrent inflammation of the anterior segment of the eye in patients resistant to standard immunomodulatory treatment. *Ann Rheum Dis* 2003; **62:** 1243-1244.
124 Joseph A *et al.* Infliximab in the treatment of refractory posterior uveitis. *Ophthalmology* 2003; **110:** 1449-1453.
125 Murphy CC *et al.* Neutralizing tumor necrosis factor activity leads to remission in patients with refractory noninfectious posterior uveitis. *Arch Ophthalmol* 2004; **122:** 845-851.
126 Reiff A *et al.* Etanercept therapy in children with treatment-resistant uveitis. *Arthritis Rheum* 2001; **44:** 1411-1415.
127 Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature* 1980; **286:** 611-613.
128 Guedes C, Dumont-Fischer D, Leichter-Nakache S, Boissier MC. Mortality in rheumatoid arthritis. *Rev Rhum Engl Ed* 1999; **66:** 492-498.
129 Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; **4 Suppl 3:** S265-272.
130 Ostensen M, Villiger PM. Immunology of pregnancy-pregnancy as a remission inducing agent in rheumatoid arthritis. *Transpl Immunol* 2002; **9:** 155-160.
131 Singal DP, Li J, Zhu Y. Genetic basis for rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1999; **47:** 307-311.
132 Moore TL. Parvovirus-associated arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; **12:** 289-294.
133 Cooke SP, Rigby SP, Griffiths DJ, Venables PJ. Viral studies in rheumatic disease. *Ann Med Interne (Paris)* 1998; **149:** 30-33.

134 Blaschke S *et al.* Epstein-Barr virus infection in peripheral blood mononuclear cells, synovial fluid cells, and synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2000; **27:** 866-873.

135 Bonneville M *et al.* Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Rev Rhum Engl Ed* 1998; **65:** 365-368.

136 Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; **344:** 907-916.

137 Duke O, Panayi GS, Janossy G, Poulter LW. An immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations and their microenvironment in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 1982; **49:** 22-30.

138 Aoki S *et al.* Role of enteric bacteria in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: evidence for antibodies to enterobacterial common antigens in rheumatoid sera and synovial fluids. *Ann Rheum Dis* 1996; **55:** 363-369.

139 Palmer DG, Hogg N, Revell PA. Lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes, macrophages and platelets in synovium involved by rheumatoid arthritis. A study with monoclonal antibodies. *Pathology* 1986; **18:** 431-437.

140 Schroder AE, Greiner A, Seyfert C, Berek C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93:** 221-225.

141 Edwards SW, Hallett MB. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 1997; **18:** 320-324.

142 Mahato RI, Takakura Y, Hashida M. Nonviral vectors for in vivo gene delivery: physicochemical and pharmacokinetic considerations. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997; **14:** 133-172.

143 Simon AK, Seipelt E, Sieper J. Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91:** 8562-8566.

144 Quayle AJ *et al.* Rheumatoid inflammatory T-cell clones express mostly Th1 but also Th2 and mixed (Th0-like) cytokine patterns. *Scand J Immunol* 1993; **38:** 75-82.

145 Tighe H *et al.* Function of B cells expressing a human immunoglobulin M rheumatoid factor autoantibody in transgenic mice. *J Exp Med* 1993; **177:** 109-118.

146 Gay S, Gay RE, Koopman WJ. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann Rheum Dis* 1993; **52 Suppl 1:** S39-47.

147 Simon M *et al.* The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1993; **92:** 1387-1393.

148 Yoshihara Y *et al.* Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; **38:** 969-975.

149 Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J* 1991; **5:** 2145-2154.

150 Jorgensen C, Angel J, Fournier C. Regulation of synovial cell proliferation and prostaglandin E2 production by combined action of cytokines. *Eur Cytokine Netw* 1991; **2:** 207-215.

151 Clavel G, Bessis N, Boissier MC. Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2003; **70:** 321-326.

152 Saidenberg-Kermanac'h N *et al.* Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation. *Joint Bone Spine* 2004; **71:** 9-13.

153 Buchan G *et al.* Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 alpha. *Clin Exp Immunol* 1988; **73:** 449-455.

154 Saxne T *et al.* Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum* 1988; **31:** 1041-1045.

155 Mauri C, Williams RO, Walmsley M, Feldmann M. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 1996; **26:** 1511-1518.

156 Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991; **34:** 1125-1132.

157 Keffer J *et al.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* 1991; **10:** 4025-4031.

158 Mori L, Iselin S, De_Libero G, Lesslauer W. Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1 (TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1996; **157:** 3178-3182.
159 Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89:** 9784-9788.
160 Wooley PH, Dutcher J, Widmer MB, Gillis S. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 1993; **151:** 6602-6607.
161 Sanders S, Harisdangkul V. Leflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Am J Med Sci* 2002; **323:** 190-193.
162 Olsen NJ, Stein CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; **350:** 2167-2179.
163 Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2003; **2:** 473-488.
164 Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977; **146:** 857-868.
165 Cathcart ES *et al.* Experimental arthritis in a nonhuman primate. I. Induction by bovine type II collagen. *Lab Invest* 1986; **54:** 26-31.
166 Boissier MC *et al.* Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. *Ann Rheum Dis* 1987; **46:** 691-700.
167 Jansson L, Holmdahl R. Oestrogen-induced suppression of collagen arthritis; 17 beta-oestradiol is therapeutically active in normal and castrated F1 hybrid mice of both sexes. *Clin Exp Immunol* 1992; **89:** 446-451.
168 Jansson L, Holmdahl R. Enhancement of collagen-induced arthritis in female mice by estrogen receptor blockage. *Arthritis Rheum* 2001; **44:** 2168-2175.
169 Terato K *et al.* Sex-linked differences in susceptibility of cynomolgus monkeys to type II collagen-induced arthritis. Evidence that epitope-specific immune suppression is involved in the regulation of type II collagen autoantibody formation. *Arthritis Rheum* 1989; **32:** 748-758.
170 Wooley PH *et al.* Type II collagen-induced arthritis in mice. III. Suppression of arthritis by using monoclonal and polyclonal anti-Ia antisera. *J Immunol* 1985; **134:** 2366-2374.
171 Michaelsson E *et al.* Macrophages, but not dendritic cells, present collagen to T cells. *Eur J Immunol* 1995; **25:** 2234-2241.
172 Holmdahl R, Tarkowski A, Jonsson R. Involvement of macrophages and dendritic cells in synovial inflammation of collagen induced arthritis in DBA/1 mice and spontaneous arthritis in MRL/lpr mice. *Autoimmunity* 1991; **8:** 271-280.
173 Holmdahl R *et al.* Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity. *Apmis* 1989; **97:** 575-584.
174 Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science* 1999; **286:** 1732-1735.
175 Horai R *et al.* Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* 2000; **191:** 313-320.
176 Cromartie WJ *et al.* Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med* 1977; **146:** 1585-1602.
177 Adams DS *et al.* Immune responses of goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Infect Immun* 1980; **28:** 421-427.
178 Pearson CM. Development of arthritis, periarthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; **91:** 95-101.
179 Potter M, Wax JS. Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAn: reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane-induced arthritis. *J Immunol* 1981; **127:** 1591-1595.
180 Dumonde DC, Glynn LE. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol* 1962; **43:** 373-383.
181 Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice. Clinical features and histopathology. *Arthritis Rheum* 1987; **30:** 201-212.
182 Courtenay JS *et al.* Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 1980; **283:** 666-668.
183 Dickens M *et al.* A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 1997; **277:** 693-696.

184 Lee JC *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther* 1999; **82:** 389-397.
185 Baeuerle PA, Baichwal VR. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol* 1997; **65:** 111-137.
186 Sajjadi FG *et al.* Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J Immunol* 1996; **156:** 3435-3442.
187 Piecyk M *et al.* TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *Embo J* 2000; **19:** 4154-4163.
188 Iyer S *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor mRNA translation by a rationally designed immunomodulatory peptide. *J Biol Chem* 2000; **275:** 17051-17057.
189 Corral LG *et al.* Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alpha inhibitory activity. *Mol Med* 1996; **2:** 506-515.
190 Corral LG *et al.* Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol* 1999; **163:** 380-386.
191 Newton RC *et al.* Biology of TACE inhibition. *Ann Rheum Dis* 2001; **60:** 25iii-32.
192 Mancini F *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)/TNF-alpha receptor binding by structural analogues of suramin. *Biochem Pharmacol* 1999; **58:** 851-859.
193 Suryaprasad AG, Prindiville T. The biology of TNF blockade. *Autoimmun Rev* 2003; **2:** 346-357.
194 Feldmann M. Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat Immunol* 2001; **2:** 771-773.
195 Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; **89:** 9784-9788.
196 Elliott MJ *et al.* Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994; **344:** 1105-1110.
197 Maini R *et al.* Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* 1999; **354:** 1932-1939.
198 Baert F *et al.* Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003; **348:** 601-608.
199 Sandborn WJ. How future tumor necrosis factor antagonists and other compounds will meet the remaining challenges in Crohn's disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2004; **4 Suppl 3:** S25-33.
200 Calabrese LH. Molecular differences in anticytokine therapies. *Clin Exp Rheumatol* 2003; **21:** 241-248.
201 Winter TA *et al.* Intravenous CDP870, a PEGylated Fab' fragment of a humanized antitumour necrosis factor antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: an exploratory study. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; **20:** 1337-1346.
202 Choy EH *et al.* Efficacy of a novel PEGylated humanized anti-TNF fragment (CDP870) in patients with rheumatoid arthritis: a phase II double-blinded, randomized, dose-escalating trial. *Rheumatology (Oxford)* 2002; **41:** 1133-1137.
203 Scallon BJ *et al.* Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions. *Cytokine* 1995; **7:** 251-259.
204 Loetscher H *et al.* Recombinant 55-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Stoichiometry of binding to TNF alpha and TNF beta and inhibition of TNF activity. *J Biol Chem* 1991; **266:** 18324-18329.
205 Haak-Frendscho M *et al.* Inhibition of TNF by a TNF receptor immunoadhesin. Comparison to an anti-TNF monoclonal antibody. *J Immunol* 1994; **152:** 1347-1353.
206 Scallon B *et al.* Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **301:** 418-426.
207 Scallon BJ *et al.* Functional comparisons of different tumour necrosis factor receptor/IgG fusion proteins. *Cytokine* 1995; **7:** 759-770.
208 Evans TJ *et al.* Protective effect of 55- but not 75-kD soluble tumor necrosis factor receptor-immunoglobulin G fusion proteins in an animal model of gram-negative sepsis. *J Exp Med* 1994; **180:** 2173-2179.

209 Wooley PH, Dutcher J, Widmer MB, Gillis S. Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1993; **151:** 6602-6607.

210 Moreland LW *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *The New England Journal of Medicine* 1997; **337:** 141-147.

211 Weinblatt ME *et al.* A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med* 1999; **340:** 253-259.

212 Tuma R, Russell M, Rosendahl M, Thomas GJ, Jr. Solution conformation of the extracellular domain of the human tumor necrosis factor receptor probed by Raman and UV-resonance Raman spectroscopy: structural effects of an engineered PEG linker. *Biochemistry* 1995; **34:** 15150-15156.

213 Solorzano CC *et al.* Pharmacokinetics, immunogenicity, and efficacy of dimeric TNFR binding proteins in healthy and bacteremic baboon. *J Appl Physiol* 1998; **84:** 1119-1130.

214 Rosenberg JJ *et al.* Development of a novel, nonimmunogenic, soluble human TNF receptor type I (sTNFR-I) construct in the baboon. *J Appl Physiol* 2001; **91:** 2213-2223.

215 Bendele AM *et al.* Effects of PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I (PEG sTNF-RI) alone and in combination with methotrexate in adjuvant arthritic rats. *Clin Exp Rheumatol* 1999; **17:** 553-560.

216 Bendele AM *et al.* Combination benefit of treatment with the cytokine inhibitors interleukin-1 receptor antagonist and PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; **43:** 2648-2659.

217 Rutgeerts P *et al.* Treatment of active Crohn's disease with onercept (recombinant human soluble p55 tumour necrosis factor receptor): results of a randomized, open-label, pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; **17:** 185-192.

218 Trinchard-Lugan I *et al.* Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human tumour necrosis factor-binding protein-1 (Onercept) injected by intravenous, intramuscular and subcutaneous routes into healthy volunteers. *Eur Cytokine Netw* 2001; **12:** 391-398.

219 Maini RN, Feldmann M. How does infliximab work in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res* 2002; **4 Suppl 2:** S22-28.

220 Feldmann M, Maini RN. Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med* 2003; **9:** 1245-1250.

221 Charles P *et al.* Regulation of Cytokines, Cytokine Inhibitors, and Acute-Phase Proteins Following Anti-TNF-{alpha} Therapy in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol* 1999; **163:** 1521-1528.

222 Taylor PC *et al.* Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; **43:** 38-47.

223 Van den Brande JM *et al.* Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; **124:** 1774-1785.

224 Catrina AI *et al.* Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: Extended report. *Arthritis Rheum* 2005; **52:** 61-72.

225 Trepicchio WL, Bozza M, Pedneault G, Dorner AJ. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *J Immunol* 1996; **157:** 3627-3634.

226 Joyce DA *et al.* Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol* 1994; **24:** 2699-2705.

227 Bessis N *et al.* Modulation of proinflammatory cytokine production in tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-transgenic mice by treatment with cells engineered to secrete IL-4, IL-10 or IL-13. *Clin Exp Immunol* 1998; **111:** 391-396.

228 Lubberts E, Joosten LA, Helsen MM, van den Berg WB. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis.

More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. *Cytokine* 1998; **10:** 361-369.
229 Triantaphyllopoulos KA, Williams RO, Tailor H, Chernajovsky Y. Amelioration of collagen-induced arthritis and suppression of interferon-gamma, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha production by interferon-beta gene therapy. *Arthritis Rheum* 1999; **42:** 90-99.
230 Dalum I *et al.* Therapeutic antibodies elicited by immunization against TNF-alpha. *Nat Biotechnol* 1999; **17:** 666-669.
231 Capini CJ *et al.* Active immunization against murine TNFalpha peptides in mice: generation of endogenous antibodies cross-reacting with the native cytokine and in vivo protection. *Vaccine* 2004; **22:** 3144-3153.
232 Friedmann T. Progress toward human gene therapy. *Science* 1989; **244:** 1275-1281.
233 Chernajovsky Y, Gould DJ, Podhajcer OL. Gene therapy for autoimmune diseases: quo vadis? *Nat Rev Immunol* 2004; **4:** 800-811.
234 Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J, Edelstein RM. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med* 2004; **6:** 597-602.
235 Wadman M. Germline gene therapy 'must be spared excessive regulation'. *Nature* 1998; **392:** 317.
236 Bachoud-Levi AC *et al.* Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther* 2000; **11:** 1723-1729.
237 Cavazzana-Calvo M *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; **288:** 669-672.
238 Aiuti A *et al.* Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 2002; **296:** 2410-2413.
239 Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 2001; **7:** 33-40.
240 Hacein-Bey-Abina S *et al.* A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; **348:** 255-256.
241 Hacein-Bey-Abina S *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; **302:** 415-419.
242 Wolff JA *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; **247:** 1465-1468.
243 Davis HL, Michel ML, Whalen RG. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum Mol Genet* 1993; **2:** 1847-1851.
244 Montgomery DL *et al.* Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol* 1993; **12:** 777-783.
245 Krieg AM. Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy. *J Gene Med* 1999; **1:** 56-63.
246 Yovandich J, O'Malley B, Jr., Sikes M, Ledley FD. Gene transfer to synovial cells by intra-articular administration of plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1995; **6:** 603-610.
247 Hengge UR *et al.* Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nat Genet* 1995; **10:** 161-166.
248 Hickman MA *et al.* Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum Gene Ther* 1994; **5:** 1477-1483.
249 Sikes ML, O'Malley BW, Jr., Finegold MJ, Ledley FD. In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. *Hum Gene Ther* 1994; **5:** 837-844.
250 Tio RA *et al.* Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum Gene Ther* 1999; **10:** 2953-2960.
251 Schwartz B *et al.* Gene transfer by naked DNA into adult mouse brain. *Gene Ther* 1996; **3:** 405-411.
252 Kuemmerle NB *et al.* Gene expression after intrarenal injection of plasmid DNA in the rat. *Pediatr Nephrol* 2000; **14:** 152-157.
253 Li H *et al.* Gene expression via direct injection of plasmid vector into the thymus. *Transplant Proc* 1997; **29:** 2220.
254 Vile RG, Hart IR. Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer Res* 1993; **53:** 3860-3864.

255 Tranchant I *et al.* Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *J Gene Med* 2004; **6 Suppl 1:** S24-35.
256 Scherman D *et al.* Application of lipids and plasmid design for gene delivery to mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol* 1998; **9:** 480-485.
257 Labat-Moleur F *et al.* An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther* 1996; **3:** 1010-1017.
258 Zabner J *et al.* Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* 1995; **270:** 18997-19007.
259 Felgner PL *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84:** 7413-7417.
260 Farhood H, Serbina N, Huang L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1235:** 289-295.
261 Voinea M, Simionescu M. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs. *J Cell Mol Med* 2002; **6:** 465-474.
262 Boussif O *et al.* Synthesis of polyallylamine derivatives and their use as gene transfer vectors in vitro. *Bioconjug Chem* 1999; **10:** 877-883.
263 Boussif O *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92:** 7297-7301.
264 Brown MD, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int J Pharm* 2001; **229:** 1-21.
265 Plank C, Mechtler K, Szoka FC, Jr., Wagner E. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther* 1996; **7:** 1437-1446.
266 Meyer O *et al.* Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides. *J Biol Chem* 1998; **273:** 15621-15627.
267 Wheeler JJ *et al.* Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. *Gene Ther* 1999; **6:** 271-281.
268 Janssen AP *et al.* Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy. *Int J Pharm* 2003; **254:** 55-58.
269 Selden RF *et al.* Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implications for gene therapy. *Science* 1987; **236:** 714-718.
270 Naffakh N *et al.* Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically modified skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92:** 3194-3198.
271 Bessis N *et al.* Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by treatment with vector cells engineered to secrete interleukin-13. *Eur J Immunol* 1996; **26:** 2399-2403.
272 Bessis N *et al.* The type II decoy receptor of IL-1 inhibits murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 2000; **30:** 867-875.
273 Roth DA *et al.* Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N Engl J Med* 2001; **344:** 1735-1742.
274 Kordower JH, Isacson O, Emerich DF. Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible? *Exp Neurol* 1999; **159:** 4-20.
275 Parrish EP *et al.* Targeting widespread sites of damage in dystrophic muscle: engrafted macrophages as potential shuttles. *Gene Ther* 1996; **3:** 13-20.
276 Akhtar I *et al.* CD4+ beta islet cell-reactive T cell clones that suppress autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1995; **182:** 87-97.
277 Chernajovsky Y *et al.* Pathogenic lymphoid cells engineered to express TGF beta 1 ameliorate disease in a collagen-induced arthritis model. *Gene Ther* 1997; **4:** 553-559.
278 Kim SH *et al.* Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express IL-4. *J Immunol* 2001; **166:** 3499-3505.
279 Wells DJ. Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther* 2004; **11:** 1363-1369.
280 Williams RS *et al.* Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88:** 2726-2730.
281 Dileo J, Miller TE, Jr., Chesnoy S, Huang L. Gene transfer to subdermal tissues via a new gene gun design. *Hum Gene Ther* 2003; **14:** 79-87.
282 Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; **356:** 152-154.

283 Zhang G *et al.* Efficient expression of naked dna delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 2001; **12:** 427-438.
284 Bekeredjian R *et al.* Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation* 2003; **108:** 1022-1026.
285 Danialou G *et al.* Ultrasound increases plasmid-mediated gene transfer to dystrophic muscles without collateral damage. *Mol Ther* 2002; **6:** 687-693.
286 Taniyama Y *et al.* Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation* 2002; **105:** 1233-1239.
287 Yamashita Y *et al.* In vivo gene transfer into muscle via electro-sonoporation. *Hum Gene Ther* 2002; **13:** 2079-2084.
288 Zeira E *et al.* Femtosecond infrared laser-an efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression. *Mol Ther* 2003; **8:** 342-350.
289 Scherer F *et al.* Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 2002; **9:** 102-109.
290 Neumann E, Schaefer_Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The Embo Journal* 1982; **1:** 841-845.
291 Potter H, Weir L, Leder P. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81:** 7161-7165.
292 Heller R, Grasso RJ. Transfer of human membrane surface components by incorporating human cells into intact animal tissue by cell-tissue electrofusion in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1024:** 185-188.
293 Grasso RJ, Heller R, Cooley JC, Haller EM. Electrofusion of individual animal cells directly to intact corneal epithelial tissue. *Biochim Biophys Acta* 1989; **980:** 9-14.
294 Orlowski S, Belehradek J, Jr., Paoletti C, Mir LM. Transient electropermeabilization of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem Pharmacol* 1988; **37:** 4727-4733.
295 Mir LM *et al.* [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *C R Acad Sci III* 1991; **313:** 613-618.
296 Gothelf A, Mir LM, Gehl J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat Rev* 2003; **29:** 371-387.
297 Mir LM *et al.* Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998; **77:** 2336-2342.
298 Rols MP *et al.* Electrochemotherapy of cutaneous metastases in malignant melanoma. *Melanoma Res* 2000; **10:** 468-474.
299 Rols MP, Tamzali Y, Teissie J. Electrochemotherapy of horses. A preliminary clinical report. *Bioelectrochemistry* 2002; **55:** 101-105.
300 Rebersek M *et al.* Electrochemotherapy with cisplatin of cutaneous tumor lesions in breast cancer. *Anticancer Drugs* 2004; **15:** 593-597.
301 Titomirov AV, Sukharev S, Kistanova E. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1088:** 131-134.
302 Heller R *et al.* In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett* 1996; **389:** 225-228.
303 Mir LM *et al.* Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *C R Acad Sci III* 1998; **321:** 893-899.
304 Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol* 1998; **16:** 867-870.
305 Rols MP *et al.* In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* 1998; **16:** 168-171.
306 Suzuki T *et al.* Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation. *FEBS Lett* 1998; **425:** 436-440.
307 Bettan M *et al.* Efficient DNA electrotransfer into tumors. *Bioelectrochemistry* 2000; **52:** 83-90.
308 Rizzuto G *et al.* Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; **96:** 6417-6422.
309 Mir LM *et al.* High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; **96:** 4262-4267.

310 Mathiesen I. Electropermeabilization of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. *Gene Therapy* 1999; **6:** 508-514.
311 Matsumoto T *et al.* Successful and optimized in vivo gene transfer to rabbit carotid artery mediated by electronic pulse. *Gene Therapy* 2001; **8:** 1174-1179.
312 Maruyama H *et al.* Skin-targeted gene transfer using in vivo electroporation. *Gene Therapy* 2001; **8:** 1808-1812.
313 Heller L *et al.* Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo. *Gene Therapy* 2000; **7:** 826-829.
314 Jayankura M *et al.* In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer. *The Journal of Gene Medicine* 2003; **5:** 618-624.
315 Harimoto K *et al.* In vivo gene transfer methods in the bladder without viral vectors. *British Journal of Urology* 1998; **81:** 870-874.
316 Blair-Parks K, Weston BC, Dean DA. High-level gene transfer to the cornea using electroporation. *J Gene Med* 2002; **4:** 92-100.
317 Dezawa M *et al.* Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: a new approach. *Micron* 2002; **33:** 1-6.
318 Lin CR *et al.* Electroporation for direct spinal gene transfer in rats. *Neuroscience Letters* 2002; **317:** 1-4.
319 Inoue T, Krumlauf R. An impulse to the brain--using in vivo electroporation. *Nature Neuroscience* 2001; **4 Suppl:** 1156-1158.
320 Vicat JM *et al.* Muscle transfection by electroporation with high-voltage and short-pulse currents provides high-level and long-lasting gene expression. *Human Gene Therapy* 2000; **11:** 909-916.
321 Scherman D, Bureau MF. In vivo DNA electrotransfer into skeletal muscle and other tissues: mechanism and applications. *STP Pharma* 2001; **11:** 69-74.
322 Bettan M *et al.* High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Molecular Therapy* 2000; **2:** 204-210.
323 Rols MP, Teissie J. Flow cytometry quantification of electropermeabilization. *Methods Mol Biol* 1998; **91:** 141-147.
324 Bureau MF, Scherman D. De l'électroporation à l'électrotransfert. *Biofutur* 2001; **210:** 1-8.
325 Teissie J, Rols MP. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys J* 1993; **65:** 409-413.
326 Faurie C *et al.* Effect of electric field vectoriality on electrically mediated gene delivery in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1665:** 92-100.
327 Faurie C *et al.* Cell and animal imaging of electrically mediated gene transfer. *DNA Cell Biol* 2003; **22:** 777-783.
328 Ohashi S *et al.* Successful genetic transduction in vivo into synovium by means of electroporation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **293:** 1530-1535.
329 Bonnafous 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. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1999; **1461:** 123-134.
330 Maccarone M, Bladergroen MR, Rosato N, Finazzi Agro AF. Role of lipid peroxidation in electroporation-induced cell permeability. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; **209:** 417-425.
331 Hartikka J *et al.* Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. 2001; **4:** 407-415.
332 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.
333 Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochimica Et Biophysica Acta* 2002; **1569:** 51-58.
334 Wang Z *et al.* Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther* 2004; **11:** 711-721.
335 Gehl J *et al.* In vivo electroporation of skeletal muscle: thresold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; **1428:** 233-240.

336 Klenchin VA *et al.* Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophysical Journal* 1991; **60:** 804-811.

337 Bureau MF *et al.* Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; **1474:** 353-359.

338 Satkauskas S *et al.* Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis. *Molecular Therapy* 2002; **5:** 133-140.

339 Paturneau-Jouas M *et al.* Electrotransfer at MR imaging: tool for optimization of gene transfer protocols--feasibility study in mice. *Radiology* 2003; **228:** 768-775.

340 Golzio M, Teissie J, Rols MP. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; **99:** 1292-1297.

341 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. *European Journal of Biochemistry* 1998; **254:** 382-388.

342 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. 2001; **4:** 317-323.

343 Cappelletti M *et al.* Gene electro-transfer improves transduction by modifying the fate of intramuscular DNA. *The Journal of Gene Medicine* 2003; **5:** 324-332.

344 Bureau MF *et al.* Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1676:** 138-148.

345 Andre F, Mir LM. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther* 2004; **11 Suppl 1:** S33-42.

346 Bloquel C, Fabre E, Bureau MF, Scherman D. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *J Gene Med* 2004; **6 Suppl 1:** S11-23.

347 Kreiss P, Bettan M, Crouzet J, Scherman D. Erythropoietin secretion and physiological effect in mouse after intramuscular plasmid DNA electrotransfer. *The Journal of Gene Medicine* 1999; **1:** 245-250.

348 Payen E *et al.* Improvement of mouse beta-thalassemia by electrotransfer of erythropoietin cDNA. *Experimental Hematology* 2001; **29:** 295-300.

349 Xue F *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.

350 Kon OL *et al.* Naked plasmid-mediated gene transfer to skeletal muscle ameliorates diabetes mellitus. *J Gene Med* 1999; **1:** 186-194.

351 Adachi O *et al.* Gene transfer of Fc-fusion cytokine by in vivo electroporation: application to gene therapy for viral myocarditis. *Gene Therapy* 2002; **9:** 577-583.

352 Watanabe K *et al.* Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin-10 by electroporation. *Circulation* 2001; **104:** 1098-1100.

353 Mallat Z *et al.* Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circulation Research (Online)* 1999; **85:** e17-24.

354 Saidenberg-Kermanac'h N *et al.* Efficacy of interleukin-10 gene electrotransfer into skeletal muscle in mice with collagen-induced arthritis. *J Gene Med* 2003; **5:** 164-171.

355 Kim JM *et al.* Electro-gene therapy of collagen-induced arthritis by using an expression plasmid for the soluble p75 tumor necrosis factor receptor-Fc fusion protein. *Gene Ther* 2003; **10:** 1216-1224.

356 Vilquin JT *et al.* Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Therapy* 2001; **8:** 1097-1107.

357 Ferrer A *et al.* Long-term expression of full-length human dystrophin in transgenic mdx mice expressing internally deleted human dystrophins. *Gene Ther* 2004; **11:** 884-893.

358 Goto T *et al.* Highly efficient electro-gene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97:** 354-359.

359 Lucas ML, Heller R. Immunomodulation by electrically enhanced delivery of plasmid DNA encoding IL-12 to murine skeletal muscle. *Mol Ther* 2001; **3:** 47-53.

360 Widera G *et al.* Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2000; **164:** 4635-4640.

361 Bachy M *et al.* Electric pulses increase the immunogenicity of an influenza DNA vaccine injected intramuscularly in the mouse. *Vaccine* 2001; **19:** 1688-1693.

362 Tawk M *et al.* High-efficiency gene transfer into adult fish: a new tool to study fin regeneration. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 2002; **32:** 27-31.

363 Soubrier F *et al.* pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. *Gene Therapy* 1999; **6:** 1482-1488.

364 Peppel K, Crawford D, Beutler B. A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity. *The Journal of Experimental Medicine* 1991; **174:** 1483-1489.

365 Mir LM *et al.* Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Comptes Rendus de L"Academie Des Sciences. Serie Iii, Sciences de La Vie* 1998; **321:** 893-899.

366 Bessis N *et al.* Syngeneic fibroblasts transfected with a plasmid encoding interleukin-4 as non-viral vectors for anti-inflammatory gene therapy in collagen-induced arthritis. *J Gene Med* 2002; **4:** 300-307.

367 Kolls J, Peppel K, Silva M, Beutler B. Prolonged and effective blockade of tumor necrosis factor activity through adenovirus-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; **91:** 215-219.

368 Quattrocchi E *et al.* Paradoxical effects of adenovirus-mediated blockade of TNF activity in murine collagen-induced arthritis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1999; **163:** 1000-1009.

369 Hirano S. Migratory responses of PMN after intraperitoneal and intratracheal administration of lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 1996; **270:** L836-845.

370 Behar-Cohen FF *et al.* Iontophoresis of dexamethasone in the treatment of endotoxin-induced-uveitis in rats. *Exp Eye Res* 1997; **65:** 533-545.

371 Boissier MC *et al.* Arthritogenicity of minor cartilage collagens (types IX and XI) in mice. *Arthritis and Rheumatism* 1990; **33:** 1-8.

372 Lefort J *et al.* Systemic Administration of Endotoxin Induces Bronchopulmonary Hyperreactivity Dissociated from TNF-{alpha} Formation and Neutrophil Sequestration into the Murine Lungs. *J Immunol* 1998; **161:** 474-480.

373 Grossin L *et al.* Direct gene transfer into rat articular cartilage by in vivo electroporation. *Faseb J* 2003; **17:** 829-835.

374 Weissleder R, Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med* 2003; **9:** 123-128.

375 Golzio M, Rols MP, Gabriel B, Teissie J. Optical imaging of in vivo gene expression: a critical assessment of the methodology and associated technologies. *Gene Ther* 2004; **11 Suppl 1:** S85-91.

376 Ishikawa H *et al.* Effect of GDNF gene transfer into axotomized retinal ganglion cells using in vivo electroporation with a contact lens-type electrode. *Gene Ther* 2005; **12:** 289-298.

377 Matsuda T, Cepko CL. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101:** 16-22.

378 Oshima Y *et al.* Targeted gene transfer to corneal endothelium in vivo by electric pulse. *Gene Ther* 1998; **5:** 1347-1354.

379 Oshima Y *et al.* Targeted gene transfer to corneal stroma in vivo by electric pulses. *Exp Eye Res* 2002; **74:** 191-198.

380 Mamiya K *et al.* Effects of matrix metalloproteinase-3 gene transfer by electroporation in glaucoma filter surgery. *Exp Eye Res* 2004; **79:** 405-410.

381 Hellal F *et al.* Pattern of cerebral edema and hemorrhage in a mice model of diffuse brain injury. *Neurosci Lett* 2004; **357:** 21-24.

382 Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM. Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; **10:** 119-130.

383 Johnson RW. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. *J Anim Sci* 1997; **75:** 1244-1255.

384 Williams RO, J G, Feldmann M, Maini R. Successful therapy of collagen-induced arthritis with TNF receptor-IgG fusion protein and combination with anti-CD4. *Immunology* 1995; **84:** 433-439.

385 Gould DJ, Bright C, Chernajovsky Y. Inhibition of established collagen-induced arthritis with a tumour necrosis factor-alpha inhibitor expressed from a self-contained doxycycline regulated plasmid. *Arthritis Res Ther* 2004; **6:** R103-113.

386 Bloquel C *et al.* Non invasive quantification of gene transfer by optical imaging in mouse muscle and knee after electrotransfer with a luciferase encoding plasmid. *soumis.* 2005.

387 Dreja H, Annenkov A, Chernajovsky Y. Soluble complement receptor 1 (CD35) delivered by retrovirally infected syngeneic cells or by naked DNA injection prevents the progression of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; **43:** 1698-1709.

388 Bessis N *et al.* Encapsulation in hollow fibres of xenogeneic cells engineered to secrete IL-4 or IL-13 ameliorates murine collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 1999; **117:** 376-382.

389 Chernajovsky Y *et al.* Inhibition of transfer of collagen-induced arthritis into SCID mice by ex vivo infection of spleen cells with retroviruses expressing soluble tumor necrosis factor receptor. *Gene Ther* 1995; **2:** 731-735.

390 Mageed RA *et al.* Prevention of collagen-induced arthritis by gene delivery of soluble p75 tumour necrosis factor receptor. *Gene Ther* 1998; **5:** 1584-1592.

391 Morita Y *et al.* Dendritic cells genetically engineered to express IL-4 inhibit murine collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 2001; **107:** 1275-1284.

392 Bandara G *et al.* Intraarticular expression of biologically active interleukin 1-receptor-antagonist protein by ex vivo gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90:** 10764-10768.

393 Makarov SS *et al.* Suppression of experimental arthritis by gene transfer of interleukin 1 receptor antagonist cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93:** 402-406.

394 Otani K *et al.* Suppression of antigen-induced arthritis in rabbits by ex vivo gene therapy. *J Immunol* 1996; **156:** 3558-3562.

395 Evans CH *et al.* Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 1996; **7:** 1261-1280.

396 Ghivizzani SC *et al.* Direct gene delivery strategies for the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Discov Today* 2001; **6:** 259-267.

397 Chan JM *et al.* Intraarticular Gene Transfer of TNFR:Fc Suppresses Experimental Arthritis with Reduced Systemic Distribution of the Gene Product. *Molecular therapy* 2002; **6:** 727-736.

398 Gouze E *et al.* In vivo gene delivery to synovium by lentiviral vectors. *Mol Ther* 2002; **5:** 397-404.

399 Zhang HG *et al.* Adeno-associated virus production of soluble tumor necrosis factor receptor neutralizes tumor necrosis factor alpha and reduces arthritis. *Hum Gene Ther* 2000; **11:** 2431-2442.

400 Pan RY *et al.* Disease-inducible transgene expression from a recombinant adeno-associated virus vector in a rat arthritis model. *J Virol* 1999; **73:** 3410-3417.

401 Pleyer U, Ritter T. Gene therapy in immune-mediated diseases of the eye. *Prog Retin Eye Res* 2003; **22:** 277-293.

402 Borras T. Recent developments in ocular gene therapy. *Exp Eye Res* 2003; **76:** 643-652.

403 Liang FQ *et al.* AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Mol Ther* 2001; **3:** 241-248.

404 Di Polo A *et al.* Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95:** 3978-3983.

405 Lawrence JM *et al.* Transplantation of Schwann cell line clones secreting GDNF or BDNF into the retinas of dystrophic Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45:** 267-274.

406 Lund RD *et al.* Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98:** 9942-9947.

407 Tao W *et al.* Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43:** 3292-3298.

408 Dezawa M *et al.* Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: a new approach. *Micron (Oxford, England : 1993)* 2002; **33:** 1-6.

409 Young JL, Benoit JN, Dean DA. Effect of a DNA nuclear targeting sequence on gene transfer and expression of plasmids in the intact vasculature. *Gene Ther* 2003; **10:** 1465-1470.

410 Deleuze V. Etude de l'électrotransfert du muscle avec un plasmide codant une cytokine anti-inflammatoire-Optimisation, cinétiques de production et de sécrétion de l'interleukine 10 et exemples d'applications sur des modèles animaux de pathologies humaines. *Thèse de l'Université Paris 7-Denis Diderot* 2002.

411 Adam D, Kessler U, Kronke M. Cross-linking of the p55 tumor necrosis factor receptor cytoplasmic domain by a dimeric ligand induces nuclear factor-kappa B and mediates cell death. *J Biol Chem* 1995; **270:** 17482-17487.

412 Deleuze V, Scherman D, Bureau MF. Interleukin-10 expression after intramuscular DNA electrotransfer: kinetic studies. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **299:** 29-34.

413 Michel CC. Cardiovascular fluid dynamics. *D.H. Bergel(Academic Press London and New York)* 1972**:** 241-298.

414 Dice JF, Dehlinger PJ, Schimke RT. Studies on the correlation between size and relative degradation rate of soluble proteins. *J Biol Chem* 1973; **248:** 4220-4228.

415 Barrett K *et al.* Cloning, expression and cross-linking analysis of the murine p55 tumor necrosis factor receptor. *Eur J Immunol* 1991; **21:** 1649-1656.

416 Christen U, Thuerkauf R, Stevens R, Lesslauer W. Immune response to a recombinant human TNFR55-IgG1 fusion protein: auto-antibodies in rheumatoid arthritis (RA) and multiple sclerosis (MS) patients have neither neutralizing nor agonist activities. *Hum Immunol* 1999; **60:** 774-790.

417 Calabrese LH. Molecular differences in anticytokine therapies. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2003; **21:** 241-248.

418 Gourin CG, Shackford SR. Production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta by human cerebral microvascular endothelium after percussive trauma. *J Trauma* 1997; **42:** 1101-1107.

419 Hellal F. Récepteur B2 de la bradykinine : une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement du traumatisme cérébral diffus ? *Thèse de l'Université Paris 5-René Descartes* 2003.

420 Oppenheim J, Feldmann M. Cytokine Reference. **1**.

421 Shohami E *et al.* Closed head injury triggers early production of TNF alpha and IL-6 by brain tissue. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; **14:** 615-619.

422 Taupin V *et al.* Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J Neuroimmunol* 1993; **42:** 177-185.

423 Mayhan WG. Cellular mechanisms by which tumor necrosis factor-alpha produces disruption of the blood-brain barrier. *Brain Res* 2002; **927:** 144-152.

424 Gascon MP *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of human urinary tumor necrosis factor binding protein in mice. *Drug Metab Dispos* 1992; **20:** 592-595.

425 Nawashiro H, Martin D, Hallenbeck JM. Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; **17:** 229-232.

426 Meistrell ME, 3rd *et al.* Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock* 1997; **8:** 341-348.

427 Wang CX, Shuaib A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol* 2002; **67:** 161-172.

428 De Kozak Y *et al.* Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by systemic and subconjunctival adenovirus-mediated transfer of the viral IL-10 gene. *Clin Exp Immunol* 2002; **130:** 212-223.

429 Verwaerde C *et al.* Ocular transfer of retinal glial cells transduced ex vivo with adenovirus expressing viral IL-10 or CTLA4-Ig inhibits experimental autoimmune uveoretinitis. *Gene Ther* 2003; **10:** 1970-1981.

430 Avunduk MC *et al.* Etanercept treatment in the endotoxin-induced uveitis of rats. *Exp Eye Res* 2004; **79:** 357-365.

431 Le CH, Nicolson AG, Morales A, Sewell KL. Suppression of collagen-induced arthritis through adenovirus-mediated transfer of a modified tumor necrosis factor alpha receptor gene. *Arthritis Rheum* 1997; **40:** 1662-1669.

432 Robbins PD, Evans CH, Chernajovsky Y. Gene therapy for arthritis. *Gene Ther* 2003; **10:** 902-911.

433 Grossin L *et al.* Gene therapy in cartilage using electroporation. *Joint Bone Spine* 2003; **70:** 480-482.

434 Ghivizzani SC *et al.* Direct adenovirus-mediated gene transfer of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha soluble receptors to rabbit knees with experimental arthritis has local and distal anti-arthritic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95:** 4613-4618.

435 Gouze E *et al.* Lentiviral-mediated gene delivery to synovium: potent intra-articular expression with amplification by inflammation. *Mol Ther* 2003; **7:** 460-466.

436 Smith R *et al.* Localized expression of an anti-TNF single-chain antibody prevents development of collagen-induced arthritis. *Gene Ther* 2003; **10:** 1248-1257.

437 Kjeken R, Tjelle TE, Kvale D, Mathiesen I. Clinical evaluation of pain and muscle damage induced by electroporation of skeletal muscle in humans. *Mol Ther* 2004; **9:** S60 (Abstract).

PUBLICATIONS

Ce travail a donné lieu à l'écriture de six articles dont un est actuellement soumis et un est en cours de préparation.

- N. Saidenberg-Kermanac'h, N. Bessis, V. Deleuze, **C. Bloquel**, M.F. Bureau, D. Scherman, and M.C. Boissier. Efficacy of interleukin-10 gene electrotransfer into skeletal muscle in mice with collagen-induced arthritis. *J Gene Med*. 2003 Feb;5(2):164-71.

- **C. Bloquel**, N. Bessis, M.C. Boissier, D. Scherman, and P. Bigey. Gene therapy of collagen-induced arthritis by electrotransfer of hTNF-α soluble receptor I variants. *Hum Gene Ther*. 2004 Feb;15(2):189-201.

- **C. Bloquel**, E. Fabre, M.F. Bureau, and D. Scherman. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *J Gene Med*. 2004 Feb;6 Suppl 1:S11-23.

- C. Trollet, M. Ibañez-Ruiz, **C. Bloquel**, G. Valin, D. Scherman and P. Bigey. Regulation of gene expression using a conditional RNA antisense strategy. *J Gen Sci Tech*, 2004, 3, 1-13.
  non inclus dans le manuscrit

- **C. Bloquel**, C. Trollet, E. Pradine, J. Seguin, D. Scherman, and M.F. Bureau. Non invasive quantification of gene transfer by optical imaging in mouse muscle and knee after electrotransfer with a luciferase encoding plasmid.
  Article soumis à *Gene Therapy*.

- **C. Bloquel**, R. Bejjani, P. Bigey, M.Doat, B. Thillaye-Goldenberg, D. BenEzra, D. Scherman, F. Behar-Cohen. Ocular ciliary muscle electrotransfer, a proof of principle, and intraocular therapeutic application using a plasmid encoding for hTNFR-Is.
  Manuscrit en préparation.

ANNEXE :

RESUME DES RESULTATS

Cette partie a pour objectif de présenter de manière globale et synthétique l'ensemble des résultats rapportés dans ce manuscrit, permettant ainsi de les consulter rapidement.

1. Electrotransfert intramusculaire

- **Effet dose**
  - ✓ Relation linéaire dose de plasmide injecté/taux de protéine détectée pour les trois variants (monomère, protéine de fusion, dimère), localement et dans le sérum.
  - ✓ Expression systémique détectée dès 1µg pour les protéines chimérique et dimérique.
  - ✓ Protéine chimérique détectée dans la circulation à des taux nettement supérieurs aux monomère et dimère.

- **Etude cinétique**
  - ✓ Localement : détection des trois variants pendant au moins 6 mois après électrotransfert de 15µg de plasmide.
  - ✓ Systémique :
    - Détection uniquement de la protéine chimérique pendant 6 mois à un taux stable et élevé (environ 3ng/mL).
    - Monomère et dimère détectés pendant environ deux semaines.

- **Etude de la dissémination du vecteur**

  Pas de diffusion dans un organe à distance du site d'injection du plasmide électrotransféré dans le muscle.

- **Evaluation des anticorps anti-hTNFR-Is**

  Aucun anticorps dirigé contre la protéine transgénique suite à électrotransfert des variants hTNFR-Is chez la souris DBA/1 (plasmide pCOR).

- **Applications thérapeutiques**

  Traumatisme crânien :
  - ✓ Production élevée de TNF-α suite au trauma :
    - Expression maximale dans le cerveau (zone traumatisée et controlatérale) dès une heure après le trauma (environ 35 ng/g cerveau).
    - Expression maximale dans la circulation 3 heures après le trauma (environ 3 ng/mL).
    - TNF-α détectable localement et dans la circulation pendant les 48 heures de l'étude.
  - ✓ variants du hTNFR-Is capables de franchir la BHE après induction du trauma : majorité des protéines dans la vasculature, mais forme fusionnée du récepteur soluble détectée dans le parenchyme cérébral 24 heures après induction du traumatisme.
  - ✓ A cette même date, détection de TNF-α local (dans le parenchyme) et sérique significativement inhibée.
  - ✓ Traitement par électrotransfert des variants du hTNFR-Is (2*25µg) : pas d'effet bénéfique sur la récupération des fonctions motrices, pas de protection contre la perte de masse ni la chute de température observées après le trauma, pas de réduction de l'œdème cérébral.

  Arthrite expérimentale au collagène :
  - ✓ Electrotransfert intramusculaire de 15µg de plasmide codant des variants du hTNFR-Is à l'apparition des signes cliniques de la maladie :
    - Inhibition modérée des signes cliniques de la maladie, semblable pour les trois variants.
    - Mise en évidence de l'importance de l'électrotransfert par comparaison des traitements par injection seule/injection+électrotransfert de plasmide.

- ✓ Electrotransfert intramusculaire de 50µg de plasmide codant des variants du hTNFR-Is à l'apparition des signes cliniques de la maladie :
  - Très nette inhibition des signes cliniques et histologiques de la maladie par traitement avec le plasmide codant la protéine de fusion.
  - Inhibition modérée des signes cliniques par traitement avec le plasmide codant la forme dimérique.
- ✓ Traitement par la protéine recombinante etanercept :
  - Très efficace avec 3 injections/semaine.
  - Augmentation du score clinique avec 2 injections/semaine.
  - Arrêt des injections : forte augmentation du score (supérieur à celui du groupe traité par un unique électrotransfert de plasmide codant la protéine de fusion).

2. Electrotransfert intra-articulaire

- **Validation**
  - ✓ Intérêt de l'électrotransfert par rapport à l'injection d'ADN nu (gène rapporteur luciférase).
  - ✓ Localisation dans le genou de l'expression réalisée macroscopiquement, par détection de bioluminescence à l'aide d'une caméra CCD.

- **Effet dose**
  - ✓ Entre 5 et 20 µg de plasmide électrotransféré en i.a : relation linéaire avec l'expression locale et systémique de la protéine, pour les trois variants.
  - ✓ Entre 20 et 60 µg : plateau ou régression.
  - ✓ Quantification :
    - Expression locale équivalente pour les protéines monomérique et chimérique (environ 10 ng/mL pour 20µg de plasmide).
    - Protéine chimérique la plus stable dans la circulation (environ 3ng/mL pour 20µg de plasmide).
    - Protéine dimérique détectée à des taux très inférieurs aux deux autres variants.

- **Etude cinétique**
  - ✓ Détection locale et sérique des trois variants pendant environ 14 jours après électrotransfert de 2*40µg de plasmide.
  - ✓ Maximum d'expression locale 8 jours après électrotransfert (environ 26 ng/mL, 12 ng/mL, et 2 ng/mL pour les formes monomérique, chimérique, et dimérique, respectivement).
  - ✓ Chez des souris arthritiques : expression systémique significativement plus élevée comparé à des souris saines ; augmentation non significative de l'expression locale.

- **Evaluation des anticorps anti-hTNFR-Is**
  - ✓ Détection d'anticorps dirigés contre la protéine de fusion 10 et 14 jours après électrotransfert de 2*40µg de plasmide chez la souris DBA/1 ; détection d'anticorps dirigés contre le monomère chez une seule souris (1/6).
  - ✓ Possibilité de réinduire l'expression du transgène suite à électrotransfert de 2*20 µg de plasmide, mais non à la dose de 2*40 µg de plasmide.

3. Electrotransfert intra-oculaire dans le muscle ciliaire

- **Validation**

  Efficacité de transfection et localisation de l'expression étudiées sur coupes histologiques à l'aide du gène rapporteur GFP.

- **Etude cinétique**

  Expression du gène rapporteur luciférase maximale 5 jours après électrotransfert, et détectable dans le muscle ciliaire pendant au moins un mois après électrotransfert de 3µg de plasmide.

- **Sécrétion de protéine**
  - ✓ Sécrétion dans l'humeur aqueuse de hTNFR-Is sept jours après électrotransfert dans le muscle ciliaire de 30 µg de plasmide codant la forme chimérique (691 pg/mL).
  - ✓ Pas de hTNFR-Is détecté dans le sérum à cette même date.

- **Uvéite expérimentale aux endotoxines**
  - ✓ Traitement par électrotransfert de 30µg de plasmide codant la protéine de fusion, ou injection seule du même plasmide, six jours avant induction d'une uvéite : inhibition très nette des signes cliniques et histologiques de la maladie.
  - ✓ Traitement par électrotransfert de 3µg de plasmide codant la protéine de fusion, ou injection seule du même plasmide, six jours avant induction d'une uvéite : inhibition significative du TNF-α local, ainsi que des signes cliniques et histologiques de la maladie pour le traitement par injection + électrotransfert uniquement.

Résumé

Le TNF-α est une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle délétère dans de nombreuses pathologies. Nous nous sommes intéressés à l'inhibition du TNF-α à l'aide de variants du récepteur soluble de type I du TNF-α (hTNFR-Is) administrés par thérapie génique non virale.

Trois variants ont été étudiés : un monomère hTNFR-Is, correspondant au récepteur soluble physiologique, une protéine chimérique hTNFR-Is/mIgG1, dont l'efficacité par administration protéique est reconnue, et une forme dimérique obtenue par association de deux fragments hTNFR-Is à l'aide d'un espaceur polyglycine.

La vectorisation des plasmides codant ces variants a été étudiée par différentes voies afin d'obtenir un effet systémique (électrotransfert intramusculaire, greffe de cellules autologues), ou un effet local (électrotransfert intra-articulaire (genou de souris), électrotransfert intra-oculaire).

L'électrotransfert intramusculaire permettait d'obtenir une expression de protéine à long terme (supérieure à 6 mois) et dose-dépendante. La protéine chimérique était très stable dans la circulation, et était sécrétée à un taux élevé. Cette procédure n'induisait pas de réponse immune contre la protéine transgénique.

Nous avons démontré l'obtention, par électrotransfert intra-articulaire, d'une expression dose-dépendante du transgène durant deux semaines. Le passage de la protéine dans la circulation était faible, ce qui était l'objectif de cette approche locale. Aux fortes doses, une réponse immune contre la protéine chimérique était observée.

Nous avons montré la faisabilité de l'électrotransfert dans un muscle lisse, le muscle ciliaire de l'œil. L'expression obtenue était uniquement localisée dans le muscle ciblé, et la procédure était sûre (pas d'inflammation ni de dommages observables). L'expression du transgène était supérieure à un mois, sans passage de la protéine dans la circulation.

L'électrotransfert intramusculaire de variants du hTNFR-Is était efficace (forme chimérique principalement) dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde (arthrite expérimentale au collagène) sur les signes cliniques et histologiques de la maladie, par un unique électrotransfert à l'apparition des signes cliniques de la maladie. La comparaison de ce traitement à l'injection répétée de protéine recombinante illustrait la potentialité d'une approche par thérapie génique, de part son efficacité à long terme.

Les approches locale et cellulaire restent à tester dans ce modèle.

L'électrotransfert intramusculaire de plasmide codant les hTNFR-Is ne permettait pas d'améliorer la récupération des fonctions motrices après un traumatisme crânien, dans un modèle murin, même si la protéine était détectée dans le cerveau, et capable d'inhiber le TNF-α. Ces résultats sont cependant très préliminaires.

L'électrotransfert intra-oculaire du plasmide codant la forme chimérique hTNFR-Is/mIgG1 permettait d'inhiber efficacement les signes cliniques et histologiques dans un modèle expérimental d'uvéite (uvéite expérimentale aux endotoxines).

Nos résultats mettent en évidence l'efficacité de l'électrotransfert pour délivrer un gène thérapeutique et obtenir une production locale ou systémique (selon la stratégie utilisée) de protéine thérapeutique.

Nos résultats illustrent le potentiel de nouvelles cibles (articulation, muscle lisse de l'œil) pour cette technologie, ce qui est encourageant pour l'application future de l'électrotransfert à d'autres tissus/organes cibles et à d'autres pathologies.

Discipline

Biologie de l'os et des articulations et biomatériaux des tissus calcifiés

---

Mots clefs

thérapie génique non virale ; électrotransfert ; inflammation ; cytokine ; TNF-α ; polyarthrite rhumatoïde ; uvéite ; traumatisme crânien

---

Laboratoires

INSERM U640 CNRS UMR8151 – Université René Descartes – 4, avenue de l'observatoire – 75006 Paris

UPRES EA3408 – UFR Léonard de Vinci – 74, rue Marcel Cachin – 93017 Bobigny cedex