



HAL
open science

Transfert de gène *in vivo*: étude, régulation et application de l'électrotransfert

Capucine Trollet

► **To cite this version:**

Capucine Trollet. Transfert de gène *in vivo*: étude, régulation et application de l'électrotransfert. Biochimie [q-bio.BM]. Chimie ParisTech, 2005. Français. NNT: . tel-00011410

HAL Id: tel-00011410

<https://pastel.hal.science/tel-00011410>

Submitted on 18 Jan 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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Ecole Doctorale Inter///Bio

Activités biologiques des substances naturelles.
Reconnaissance moléculaire et communications cellulaires.

présentée par

Capucine TROLLET

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de la thèse:

**Transfert de gène *in vivo*:
étude, régulation et application de l'électrotransfert**

soutenue le 26 Septembre 2005

devant le jury composé de:

Mme Mireia Pelegrin	Chargé de Recherche, CNRS, Montpellier	Rapporteur
Mme Véronique Preat	Professeur à l'UCL, Bruxelles	Rapporteur
M. Jean Delettre	Professeur à l'Université Paris VI	Examineur
M. Michel Popoff	Directeur de Recherche, Institut Pasteur, Paris	Examineur
M. Pascal Bigey	Maître de conférence, ENSCP, Paris	Examineur
M. Daniel Scherman	Directeur de Recherche, CNRS, Paris	Directeur de thèse

Remerciements

«*A goal is a dream with a deadline.*».

J'ai lu cette phrase dans le métro de Londres il y a quelques semaines, me rendant à un entretien pour un éventuel postdoc. Elle m'a marquée car c'est un peu la définition que je donnerais de ma thèse : un rêve avec une date limite. Et je n'étais pas seule dans ce rêve, loin de là ! Je tiens donc à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de rêver et d'atteindre ce but.

Je tiens tout d'abord à remercier **Daniel Scherman** qui m'a accueillie dans son laboratoire, à Vitry à l'époque, puis ici à la Faculté de Pharmacie. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée depuis mon stage de microthèse de l'ENSCP jusqu'à la fin de ma thèse.

Je remercie **Mireia Pelegrin** et **Véronique Preat** d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'être rapporteurs de cette thèse.

Je souhaite remercier **Michel Popoff** d'avoir accepté d'être examinateur. Je vous remercie également pour le travail que nous avons réalisé avec votre laboratoire à l'Institut Pasteur. J'ai été ravie de travailler avec vous et votre équipe.

Je remercie **Jean Delettre** d'avoir accepté d'être examinateur. Merci également pour votre disponibilité, vos conseils et votre écoute en tant que Directeur de l'Ecole Doctorale Inter///Bio. Vos conseils sont toujours utiles et j'essayerai d'en faire bon usage.

Je tiens à remercier **Pascal Bigey** qui m'a encadré pendant ces trois années. Je te remercie en particulier pour toutes tes techniques de biologie moléculaire «à la Pascal» dont je raffole et qui marchent (!!), je crois même que pour les clonages, j'ai presque rattrapé mon maître, non ? Tu as eu bien du courage de supporter mon bavardage incessant dès que je passais la porte de ton bureau. Merci pour ton aide, pour tes cadeaux en chocolat (y a encore pas mal de chocolateries dans Paris que je connais pas), et n'oublie pas Pascal : la vie est belle en rose !!

Je souhaite remercier **Virginie Escriou** qui m'a soutenue tout au long de cette thèse en véritable «coach». Je te remercie en particulier pour ton aide et ta disponibilité pendant ces trois ans et surtout pendant cette période de rédaction. Je vais essayer à l'avenir d'appliquer tes conseils tant sur le plan professionnel que culinaire (c'est pas un zeugma là ?).

Je voudrais remercier également du fond du coeur **Céline Largeau**, qui a été à mes côtés depuis le début (et oui 5 ans déjà !). C'est le meilleur professeur que je connaisse, puisqu'elle m'a tout appris de la transfection à l'immunofluorescence en passant par le Western Blot, avec pour chaque protocole des fiches impeccables qui vont se vendre à prix d'or ! Merci aussi pour les prélèvements de sang que tu réussis comme une pro. Je te remercie pour tous ces bons moments passés ensemble, j'espère qu'il y en aura bien d'autres. Merci pour ton aide et ton amitié qui m'ont été bien précieuses au quotidien... j'espère que notre duo de choc va continuer.

Je voudrais remercier **Johanne Seguin**, alias «Jojo», qui m'a aidée à vaincre (enfin presque !!) ma peur des souris. Ton aide sur toutes les expériences sur les animaux m'a été bien précieuse : tu vises avec une précision de professionnelle le muscle tibial cranial et tu bats des records en temps pour les prélèvements de souris. Un merci tout particulier pour les manips sur les lapins. Tu as su dompter Mystère et Bouledegomme avec patience (et oui !!) et efficacité.

Je voudrais dire un immense merci à **Hervé Rhinn** qui a survécu à mes bavardages ininterrompus à un mètre de moi depuis trois ans. Merci pour tes relectures, tes précieux conseils et ton aide sur de nombreuses questions scientifiques. Merci pour le chocolat et ses dérivés, pour tes histoires à dormir debout, tes photos, ton light-cycler et nos projets sous-marins. Je te laisse un pense-bête : le génome de la souris

c'est 3,4 millions de pb, 1 base = 300g/mol, et 1 μ g correspond à 300 000 cellules. Comme ça tu l'auras à portée de main !! Et au fait, la cafetière est pour toi, je sais que tu l'aimes tant.

Je voudrais dire un grand merci à **Anne Rübenstrunk**, ancienne thésarde du laboratoire. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris à mes débuts, merci aussi pour ton soutien, ton amitié, ta confiance et notre travail en équipe sur ton système de régulation.

Je voudrais remercier **toute l'équipe de Michel Popoff** de l'Insitut Pasteur avec qui j'ai collaboré. Merci tout particulièrement à **Yannick Pereira** et **Maria Manich** qui m'ont accueillie au sein de leur laboratoire pour les tests de neutralisation. Je vous remercie mille fois tous les deux pour votre aide. Merci Yannick pour ton soutien tout au long de ma thèse et bonne chance pour la suite ! Merci Maria pour tes injections impeccables et pour nos discussions bien agréables.

Un grand merci à **Rachel Carton** et **Nathalie Ausseur** qui m'ont bien aidées sur les dosages ELISA pendant leurs stages BTS. Merci Rachel pour tes manips impeccables et l'entraîn que tu as mis à les réaliser.

Merci à **Myriam Mezrahi** et **Elodie Litzler** pour leur travail sur les toxines B et E lors de leur stage de DEA. J'ai été ravie de travailler avec vous pendant ces quelques mois.

Merci à **Gabrielle Valin** qui a fait un énorme travail sur le système de régulation.

Je voudrais remercier **Michel Bureau** avec qui j'ai travaillé sur l'imagerie optique. Merci Michel pour cette collaboration fructueuse, merci pour ton aide et surtout Michel : soit positif !

Je voudrais également remercier **Michel Bessodes** qui m'a aidé à réaliser la toute petite réaction chimique de ma thèse, à savoir la synthèse de la tyramide-biotine.

Je remercie enfin **Jean-Michel Caillaud** (Société Biodoxis) avec qui j'ai été ravie de collaborer et qui a réalisé et analysé l'étude histologique sur les coupes de muscles de souris, merci aussi à **Hervé Volland** (CEA) qui m'a gracieusement donné 12 anticorps monoclonaux contre le FcBoNTA, et merci enfin à **Chantal Martin** qui nous a bien aidés sur l'expérience avec les lapins.

Je tiens à remercier **Emmanuelle Fabre** qui m'a soutenue pendant cette rédaction de thèse. Je suis de tout coeur avec toi pour la suite et je te souhaite bonne chance !

Je tiens à remercier **Jeanne Chain** avec qui j'ai été ravie de créer l'exposé «Bullons ensemble !» au Palais de la Découverte. J'en profite pour remercier l'ensemble du **Département Chimie du Palais de la Découverte** au sein duquel j'ai réalisé mon monitorat. Merci à tous pour votre bonne humeur et votre enthousiasme.

Je tiens enfin à remercier **l'ensemble du laboratoire** : les chimistes, les physico-chimistes, les biologistes, l'équipe administrative et l'équipe d'entretien.

Un grand merci enfin à mon papa, à Romain (et Tiffany), Julien et Pauline, mes grands-parents, et toute ma famille pour leur soutien au quotidien. Merci à Erika, bonne chance pour la fin ! Merci enfin à Benoît, qui sera ravi que je le cite ! Merci aussi à ses parents qui nous ont préparé de bons petits plats pendant cette période de rédaction.

Table des matières

Liste des abréviations

9

Introduction	11
1 Introduction au transfert de gène	11
1.1 Principe	11
1.2 Les stratégies	11
1.3 Les cellules cibles	13
1.4 Les barrières au transfert de gène	13
1.5 Les vecteurs viraux	14
1.6 Les vecteurs non viraux	16
2 Electrotransfert	20
2.1 Historique	20
2.2 Mécanisme de l'électrotransfert à l'échelle de la cellule	21
2.3 Mécanisme de l'électrotransfert <i>in vivo</i>	24
2.4 Réalisation pratique	25
2.5 Tissus cibles	29
3 Applications thérapeutiques de l'électrotransfert	32
3.1 Sécrétion ectopique de protéines	32
3.2 Maladies musculaires	33
3.3 Production d'anticorps par immunisation génétique	34
3.4 Cancers	35
3.5 Electrotransfert comme un outil	35
4 Régulation temporelle de l'expression des gènes	36
4.1 Une large étendue d'applications	36
4.2 Stratégies de régulation de l'expression d'un gène	37
4.3 Régulation par neutralisation du gène ou de son ARN messager	38
4.4 Régulation par un contrôle de l'initiation de la transcription	43
5 Description du projet de thèse	50

Matériel et Méthodes		51
1	Vecteurs plasmidiques	51
1.1	Plasmides courants	51
1.2	Plasmides pour la construction du système de régulation	52
1.3	Plasmides utilisés pour l'imagerie	54
1.4	Plasmides pour l'obtention d'antisérum	54
1.5	Purification des plasmides	56
2	Microbiologie	58
2.1	Génotypes et caractéristiques des souches d' <i>E. coli</i>	58
2.2	Milieux de culture	58
2.3	Préparation de bactéries compétentes	58
2.4	Transformation de bactéries compétentes par choc thermique	58
2.5	Transformation de bactéries compétentes par électroporation	59
3	Biologie moléculaire	59
3.1	Electrophorèse analytique et préparative des acides nucléiques	59
3.2	Extraction d'ADN	59
3.3	Extraction d'ARN	60
3.4	Traitement à la DNase des ARN	60
3.5	Quantification de l'ARN et de l'ADN	60
3.6	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	61
3.7	RT-PCR	61
3.8	PCR en temps réel	61
3.9	Traitement au bisulfite	63
3.10	PCR nichée après traitement au bisulfite	63
3.11	RAIC PCR (Repeat-Anchored Integration Capture)	63
3.12	Séquençage	65
4	Biologie cellulaire	65
4.1	Culture cellulaire	65
4.2	Transfection <i>in vitro</i>	65
5	Biochimie	66
5.1	Dosages biochimiques	66
5.2	Dosages ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay)	67
5.3	Immunofluorescence	71
5.4	Western-Blot	71
6	Expérimentation animale	73
6.1	Animaux	73

6.2	Anesthésie	73
6.3	Transfert de gènes <i>in vivo</i> dans le muscle squelettique de souris	73
6.4	Transfert de gènes <i>in vivo</i> en intradermique chez la souris	74
6.5	Transfert de gènes <i>in vivo</i> dans le muscle chez le lapin	74
6.6	Prélèvements	74
6.7	Histologie	75
6.8	Test de neutralisation	75
7	Imagerie du petit animal	76
7.1	Préparation de l'animal	76
7.2	Caméra CCD	76
8	Statistiques	76

Résultats

77

Chapitre 1

Suivi du transfert de gène par imagerie optique

79

1.1	Introduction	79
1.2	Contexte	79
1.3	Système de détection	80
1.4	Signaux optiques	81
1.4.1	Bioluminescence	81
1.4.2	Fluorescence	81
1.4.3	Avantages et inconvénients	83
1.5	Exemples d'application	84
1.5.1	Electrotransfert intramusculaire	84
1.5.2	Suivi de l'expression de la GFP à long terme	85
1.6	Première mise au point : effet de la hyaluronidase	85
1.6.1	Intérêt de la hyaluronidase	85
1.6.2	Mise en oeuvre	86
1.7	Deuxième mise au point : électrotransfert intradermique	87
1.7.1	La peau : cible de choix	87
1.7.2	Mise en oeuvre	88
1.8	Conclusion et perspectives	91

Chapitre 2

Système de régulation de l'expression de gène par stratégie antisens

93

2.1	Introduction	93
-----	------------------------	----

2.2	Choix de la stratégie	94
2.2.1	Choix du système Tet-Off	94
2.2.2	Choix d'une stratégie antisens	94
2.3	Description du système de régulation	95
2.4	Constructions plasmidiques	96
2.5	Stratégie antisens	97
2.5.1	Inhibition <i>in vitro</i> de l'expression d'un gène par un ARN antisens	98
2.5.2	Spécificité de l'antisens <i>in vitro</i>	98
2.5.3	Inhibition <i>in vivo</i> de l'expression d'un gène par un ARN antisens	100
2.6	Système de régulation par un antisens conditionnel	103
2.6.1	Evaluation du système de régulation <i>in vitro</i>	103
2.6.2	Régulation à long terme de l'expression de la hSeAP <i>in vivo</i> avec un système à trois plasmides	108
2.6.3	Régulation à long terme de l'expression de la hSeAP <i>in vivo</i> avec un système à deux plasmides	109
2.6.4	Régulation à long terme de l'expression de l'Epo <i>in vivo</i>	112
2.6.5	Remarque : étude de l'effet d'un ARN double brin dans une cellule	120
2.7	Conclusions et Perspectives	122

Chapitre 3

Obtention d'antisérums antitoxines botuliques

123

3.1	Les toxines botuliques	123
3.1.1	Organisation fonctionnelle	124
3.1.2	Mécanisme d'action	124
3.1.3	Le botulisme	126
3.1.4	Applications thérapeutiques	126
3.1.5	Bio-terrorisme	127
3.1.6	Stratégies actuelles anti-toxines	127
3.2	Procédés d'obtentions d'antisérums anti-BoNT	128
3.3	Fragment immunogène	129
3.4	Mécanisme de l'immunisation par ADN	130
3.5	Description du projet	133
3.6	Première évaluation : antisérums anti-BoNTA	134
3.6.1	Construction et validation du matériel génétique de départ	134
3.6.2	Première évaluation <i>in vivo</i> : preuve du concept	134
3.6.3	Test de neutralisation	136
3.7	Optimisation du fragment immunogène	138

3.7.1	Optimisation des codons	138
3.7.2	Ajout d'un signal de sécrétion	139
3.7.3	Constructions des vecteurs optimisés	140
3.7.4	Validation des vecteurs optimisés	140
3.7.5	Electrotransfert <i>in vivo</i> des différentes constructions	143
3.8	Optimisation du protocole	147
3.8.1	Effet de la hyaluronidase	149
3.8.2	Electrotransfert intradermique	151
3.8.3	Injections multiples	153
3.9	Caractérisation des antisérums	155
3.10	Antisérums anti-BoNTB et anti-BoNTE	158
3.10.1	Construction et validation du matériel génétique de départ	158
3.10.2	Etude <i>in vivo</i>	159
3.11	Sérums multivalents	160
3.12	Application de la technique au lapin	163
3.12.1	Choix du protocole	163
3.12.2	Réalisation	164
3.13	Conclusion et Perspectives	165
3.13.1	Remarques générales	165
3.13.2	Bilan	165
3.13.3	Perspectives	166

Chapitre 4

Etude de l'état de l'ADN plasmidique après injection et électrotransfert 167

4.1	Contexte de travail	167
4.2	Détection du plasmide sous forme épisomale	168
4.3	Etude de la possible intégration de l'ADN plasmidique	170
4.3.1	Stratégie n°1 : utilisation de séquences répétitives B1 et B2	171
4.3.2	Stratégie n°2 : LAM-PCR	173
4.3.3	Stratégie n°3 : amorce biotinylée + LAM-PCR	175
4.3.4	Stratégie n°4 : la PCR RAIC	177
4.3.5	Étude de la persistance du plasmide par PCR quantitative	180
4.4	Etude de l'état de méthylation du promoteur CMV	181
4.4.1	Introduction : la méthylation	181
4.4.2	Objectif de l'étude	181
4.4.3	Traitement au bisulfite	182
4.4.4	Choix des amorces et mise au point avec le plasmide pXL3010	182

4.4.5 Etude de l'état de méthylation du promoteur CMV <i>in vivo</i>	186
4.5 Conclusions et Perspectives	187

Conclusion	191
-------------------	------------

Bibliographie	195
----------------------	------------

Publications	213
---------------------	------------

Liste des abréviations

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

AAV	virus associé à l'adénovirus
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag85B	antigène de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
APC	cellule présentatrice d'antigène
ARN	acide ribonucléique
ARNi	acide ribonucléique interférence
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
BEt	bromure d'éthidium
bp	paire de bases
BoNT	toxine botulique
BSA	albumine bovine sérique
CCD	<i>charged coupled device</i>
CMH	classe majeure d'histocompatibilité
CMV	cytomegalovirus
cpm	coups par minute
DAB	3,3' Diaminobenzidine
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindone
db	double brin
DMEM	Dubelcco's Mod Eagle Medium
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DNase	désoxyribonucléase
dNTP	nucléotides
DO	densité optique
DOPE	dioléoylphosphatidyléthanolamine
DTT	DL-dithiothréitol
EDTA	éthylènediamine acide tétraacétate
ELISA	<i>enzyme linked-immuno-sorbent assay</i>
env	gène de l'enveloppe
Epo	érythropoïétine
ET	électrotransfert
FcBoNT	fragment C-terminal de la toxine botulique

gag	group specific antigen
GFP	green fluorescent protein
GHRH	<i>growth hormone releasing hormone</i>
GMP	<i>good manufacturing product</i>
HBsAg	antigène de surface de l'hépatite B
hFIX	facteur IX humain
hSeAP	phosphatase alcaline sécrétée humaine
HIV	virus de l'immunodéficience humaine
Hsp65	<i>mycobacterial heat shock protein</i>
HSV	herpes simplex virus
i.m	intra-musculaire
ITR	<i>inversed terminal repeat</i>
LacZ	gène de la β -galactosidase
LB	milieu Luria Bertani
Luc	luciférase de <i>Photinus Pyralis</i>
MLD	<i>mouse letal dose</i>
MPB70	<i>Mycobacterium tuberculosis complex protein</i>
Nb.	nombre
N.S	non significatif
nt	nucléotide
p.	impulsions
pb	paire de base
PBS	solution saline tamponnée au phosphate
pCOR	plasmide à origine de répllication conditionnelle
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PEG	polyéthylène glycol
PEI	polyéthylène imine
PET	tomographie par émission de positons
PFA	paraformaldéhyde
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
RAIC	<i>repeat-anchored integration capture</i>
RMN	résonance magnétique nucléaire
RNase	ribonucléase
RT	<i>reverse transcription</i>
RT	transcription inverse
sb	simple brin
SCID	immunodéficience sévère combinée
SD	déviatiion standard (écart type)
SDS	dodécyl sulfate de sodium
TBE	Tris-borate EDTA
TEA	triéthylamine
Tet	tétracycline
TetO	opérateur sensible à la tétracycline
TetR	répresseur sensible à la tétracycline
trs/min	tours par minute
TSA	<i>tyramide system amplification</i>
UDG	<i>uracil-DNA glycosylase</i>
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

Introduction

1 Introduction au transfert de gène

1.1 Principe

Le transfert de gène consiste à introduire un matériel génétique (sous forme d'ADN ou d'ARN) dans une cellule cible pour conduire à un effet physiologique souhaité (comme par exemple corriger un gène défectueux, inhiber ou stimuler la synthèse d'une protéine).

Le concept initial associé à la notion de transfert de gène était celui de la thérapie génique, c'est à dire la compensation de gènes dont l'altération est responsable de maladies. Puis cette notion a été étendue à l'utilisation du gène comme nouveau type de médicament. Dès lors elle a rapidement débouché sur des indications débordant largement le cas des maladies génétiques puisqu'un gène médicament peut, à priori, remplacer n'importe quel médicament protéique dont il commandera la synthèse et la délivrance même [1].

1.2 Les stratégies

De nombreuses stratégies moléculaires de transfert de gène peuvent être envisagées selon l'application souhaitée. Aujourd'hui, avec le décryptage de l'ensemble du génome humain, le champ d'applications du transfert de gène s'est fortement élargi. Le transfert d'un gène apparaît aujourd'hui comme une stratégie séduisante, non seulement pour le traitement de maladies monogéniques telles que la mucoviscidose ou la dystrophie musculaire de Duchenne, pour le traitement de maladies plus complexes ayant des composantes génétiques telles que le cancer, le diabète ou les maladies cardiovasculaires, mais également pour la vaccination ou même l'étude de fonctions de gènes.

Remplacer un gène déficient par l'ADN complémentaire correspondant fonctionnel : il s'agit alors de corriger un défaut de fonction en apportant la protéine manquante comme dans les maladies monogéniques, telles que la mucoviscidose (dérèglement de la protéine CFTR, Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator, due à une mutation), les myopathies (mutation du gène de la dystrophine pour la myopathie de Duchenne, par exemple) ou les déficiences immunitaires (SCID, déficit en adénosine désaminase, par exemple).

Inhiber le fonctionnement d'un gène muté ou inactiver son produit protéique : dans certains cas l'apport d'un gène fonctionnel ne suffit pas. En effet lorsqu'une mutation dans un gène entraîne un gain de fonction, les symptômes de la maladie sont liés à la synthèse d'une protéine anormale à effets délétères.

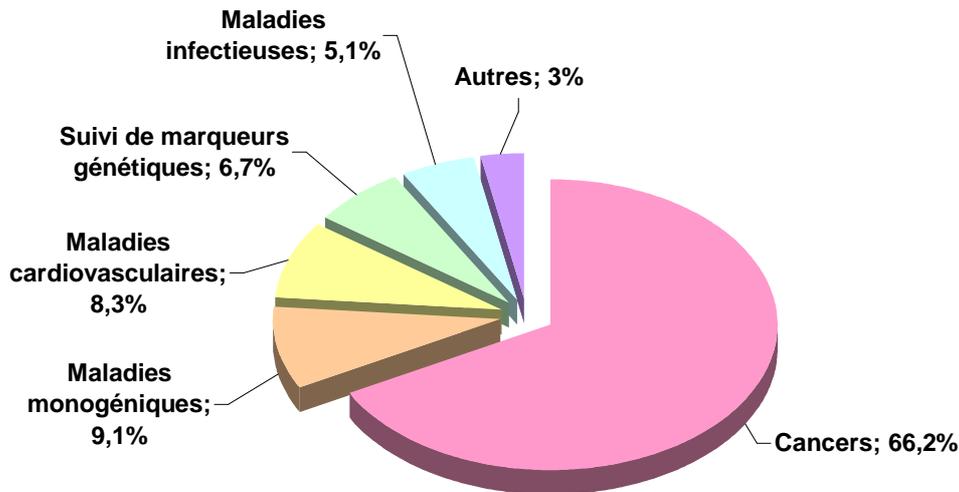


FIG. 1 – *Les cibles thérapeutiques du transfert de gène (Source 2005)*. Avec la permission de Wiley Genetic Medicine web site : <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>. Le pourcentage indiqué correspond au nombre de protocoles d'essais cliniques menés dans les différents domaines.

Corriger une mutation ponctuelle : lorsqu'il n'est pas possible d'ajouter un gène fonctionnel pour remplacer un gène défectueux, une approche alternative consiste à effectuer une correction du gène *in situ*. L'objectif de cette stratégie est de corriger des mutations ponctuelles dans la cellule en utilisant par exemple des oligonucléotides hybrides ARN-ADN (chiméraplastes) ou des oligonucléotides simples brins [2].

Corriger un épissage alternatif incorrect : en introduisant un acide nucléique «anti-sens» inhibant [3] ou stimulant [4] l'épissage défectueux d'un exon .

Introduire un gène conduisant à la mort d'une cellule malade : ceci peut être fait directement en introduisant un gène apoptotique par exemple ou indirectement en sensibilisant par exemple des cellules cancéreuses à des médicaments : on introduit dans les cellules cancéreuses un gène qui code une enzyme activant un médicament inactif administré au patient, ce médicament activé détruit alors les cellules cancéreuses [5].

Ajouter un gène au génome d'une cellule pour produire une protéine thérapeutique : les cellules cibles sont alors utilisées pour l'expression de protéines thérapeutiques pour des facteurs de croissance (maladies cardiovasculaires : VEGF), des facteurs de coagulation (facteurs VIII et IX sanguins pour l'hémophilie), des interleukines, l'érythropoïétine (pour la β -thalassémie ou l'anémie), des anticorps monoclonaux [6] ou comme source d'antigène pour la vaccination génétique et la production d'antisérums.

Stimuler une réponse immune au niveau des cellules cibles : il peut s'agir par exemple d'intégrer dans des cellules cancéreuses des gènes codant des protéines qui stimulent le système immunitaire (cytokines, molécules du CMH, antigènes tumoraux). Ce dernier détruit ainsi les cellules tumorales (immunothérapie). Cette stratégie peut être utilisée aussi dans le cas

de maladies infectieuses en rendant des cellules cibles résistantes à un virus ou productrices de protéines antivirales.

Etudier la fonction d'un gène : au cours des dernières années, un nombre impressionnant de gènes ont été découverts grâce au séquençage et au décriptage progressif du génome de nombreuses espèces. Il s'agit donc maintenant de trouver les fonctions de ces gènes.

«**Gene farming**» : De nombreuses molécules pharmaceutiques sont des protéines complexes obtenues par culture de cellules génétiquement modifiées. Dans certains cas, le procédé de production est très coûteux et la fabrication de médicament par ce biais est dans la pratique impossible. Pour contourner ce problème, une stratégie consiste à faire produire ces protéines complexes par des animaux [7].

Aujourd'hui l'évolution de la thérapie génique repose essentiellement sur le développement de systèmes de transfert de gène : ils doivent être sûrs, efficaces et capables d'exercer leur fonction sur de nombreux types cellulaires.

1.3 Les cellules cibles

Les seules cellules traitées sont les cellules somatiques et selon l'indication souhaitée le transfert de gène peut se faire par deux approches conceptuellement différentes : «*ex vivo*» et «*in vivo*». Un traitement *ex vivo* implique un prélèvement des cellules du patient, leur modification par transfert de gène puis leur réinjection chez le patient. Un traitement *in vivo* implique une injection directement au patient. L'administration se fait soit par voie locale (injection directe dans le tissu à traiter ou instillation pulmonaire) soit par voie systémique (injection intraveineuse). L'administration locale présente l'avantage de concentrer l'ADN thérapeutique dans le tissu cible (muscle, tumeur, poumon, peau par exemple) et d'éviter ainsi une trop grande perte d'ADN. L'administration systémique est moins utilisée car elle pose un problème de ciblage cellulaire évident ; elle peut entraîner des phénomènes de toxicité au niveau des organes non ciblés ; enfin, l'ADN véhiculé peut être rapidement dégradé dans la circulation, s'il n'est pas protégé [8]. Les organes tels que le foie, les poumons ou les reins sont des cibles privilégiées lors d'injections systémiques du vecteur [8].

1.4 Les barrières au transfert de gène

L'acide nucléique doit franchir de nombreuses barrières biologiques (extracellulaires et intracellulaires) pour atteindre le noyau des cellules cibles. Brièvement, l'acide nucléique doit passer la peau, première barrière biologique, puis être véhiculé jusqu'au tissu cible, passer la barrière vasculaire et les tissus conjonctifs pour enfin arriver aux cellules cibles et là passer la membrane plasmique délimitant la cellule, traverser le cytosol (en évitant les nucléases) et enfin franchir l'enveloppe nucléaire. C'est donc un parcours semé d'embûches. Pour y parvenir il est donc indispensable de disposer de moyens permettant de surmonter ces multiples barrières, et ce n'est à l'heure actuelle que grâce au développement de tels moyens que de réelles réussites en thérapie génique verront le jour.

Dans ce but, différentes techniques ont été mises au point pour permettre ce transfert de gène. La maladie à traiter, la nature du gène à transférer, son mode d'action, la durée d'expression recherchée, les cellules ou tissus cibles sont autant de paramètres qui en déterminent le choix.

Le vecteur idéal au transfert de gène (figure 2) devra avoir les critères suivants : (1) spécifique vis-à-vis des cellules cibles, (2) sans dissémination du gène dans tout l'organisme, (3) résistant

aux dégradations métaboliques et/ou aux attaques par le système immunitaire, (4) sûr, c'est-à-dire avoir le moins d'effets secondaires, et (5) capable d'exprimer de manière régulable le gène d'intérêt thérapeutique aussi longtemps que nécessaire [9]. Les méthodes de transfert de gène sont en général divisées en deux : (a) le transfert par des vecteurs biologiques viraux, (b) le transfert par des approches chimiques ou physiques qualifiées de non virales.

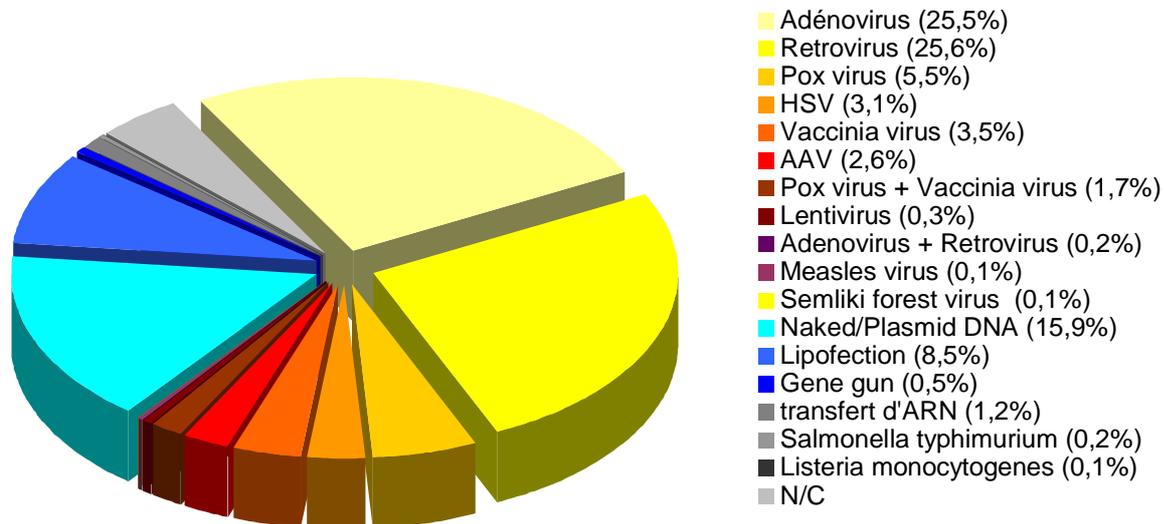


FIG. 2 – *Les vecteurs de transfert de gène utilisés en essai clinique (Source 2005)*. Avec la permission de Wiley Genetic Medicine web site : <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>. Le pourcentage indiqué correspond au nombre de protocoles d'essais cliniques menés avec les différents vecteurs.

1.5 Les vecteurs viraux

Parmi les différentes techniques de transfert de gène dans les cellules cibles d'un organisme, une première technique consiste à transporter l'acide nucléique d'intérêt grâce à des vecteurs viraux, utilisant la capacité des virus à pénétrer dans les cellules hôtes pour y transférer leur génome [10–12].

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

Les caractéristiques des principaux vecteurs viraux sont présentées dans le tableau 1.

Rétrovirus

Les **rétrovirus** (virus à ARN, capacité d'insert $\leq 8\text{kb}$) ont été les premiers virus testés, dès 1981 [13]. Ils sont capables de transduire une grande fraction de cellules cibles en mitose et de permettre une intégration stable du matériel génétique dans le génome des cellules cibles. Les

	Rétrovirus	Lentivirus	Adénovirus	AAV	HSV
Type de virus	ARN	ARN	ADNdb	ADNsb	ADNdb
Infection des cellules quiescentes	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Production à haut titre	+	++	++++	+	+++
Intégration	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Capacité	≤8kb	≤8kb	≤8kb	≤5kb	≤40kb
Stabilité	++	++	+	++	++
Potentiel inflammatoire	faible	faible	fort	faible	fort
Avantages	Thérapie <i>ex vivo</i> , faible immunogénicité, expression à long terme	Infection des cellules quiescentes, expression à long terme	Efficacité de transfection, tropisme naturel pour les voies aériennes, production à haut titre	Large tropisme, non inflammatoire, non pathogène	Large capacité d'insert, fort tropisme pour les neurones
Limitations	Faible efficacité de transfection <i>in vivo</i> , problème de production, insertion mutagénique	Pathogène, problème de production, insertion mutagénique	Immunogène, inflammatoire (capside), stabilité moyenne	Faible capacité d'insert, problème de production, effet cytopathique	Expression transitoire dans cellules (autres que neurones), inflammatoire, immunogène

TAB. 1 – *Vecteurs viraux.*

gènes transférés sont ainsi transmis aux générations successives de cellules filles, permettant ainsi une expression stable à long terme. Cependant leur emploi reste limité au transfert de gène dans des cellules en division et également à des cellules facilement prélevables pour des stratégies *ex vivo*. En effet ils sont rapidement inactivés par le système du complément lorsqu'ils sont injectés par voie systémique. Les essais menés *in vivo* ont montré une efficacité de transfection réduite. De plus l'obtention des quantités de virus nécessaires à des essais cliniques est difficile et coûteuse. Mais la principale restriction à l'utilisation clinique de ces vecteurs est le risque de mutation insertionnelle [14, 15].

Actuellement de gros progrès sont faits pour développer d'autres vecteurs rétrovirus : les **lentivirus** (virus à ARN, capacité d'insert $\leq 8\text{kb}$) et plus particulièrement le virus de l'immunodéficience humaine (HIV). Ils ont eux, la capacité de transduire des cellules qui ne se divisent pas [16]. Leur supériorité pour l'application directe *in vivo* (cerveau, rétine, muscle, foie) a été démontrée [16, 17].

Adénovirus

Les **adénovirus** (virus à ADNdb, capacité d'insert $\leq 8\text{kb}$) sont également largement utilisés. Ils sont capables d'infecter de nombreux types de cellules quiescentes ou en division [18]. Ils ont un tropisme naturel pour les voies aériennes supérieures. L'expression du transgène est transitoire ce qui peut être à la fois un avantage et un inconvénient. Leur principal défaut est leur forte immunogénicité due à l'expression résiduelle de protéines virales : des adénovirus plus récents sont donc développés en délétant toute la séquence codante sauf les ITR (Inversed Terminal Repeat) permettant ainsi une moins forte immunogénicité [19]. Des vecteurs adénovirus sont

actuellement testés en phase II et III d'essais cliniques pour des applications angiogéniques et pour le cancer [20].

«Adeno Associated Virus» (AAV)

Les vecteurs issus de virus associés aux adénovirus, nommés **AAV** (capacité d'insert $\leq 8\text{kb}$) tirent leur nom du fait qu'ils ont besoin de l'aide d'un autre virus (adénovirus ou HSV) pour accomplir leur cycle complet de réplication. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules cibles quiescentes ou en division. Les vecteurs AAV semblent conjuguer les avantages des rétrovirus et de adénovirus. Le virus sauvage ne présente aucune toxicité pour l'homme mais une contamination potentielle par le virus helper est possible pendant la préparation. Malgré les problèmes d'immunogénicité qu'ils entraînent, les vecteurs AAV semblent très prometteurs de part leur efficacité de transfection *in vivo*. En effet, les premiers essais *in vivo* ont montré une expression stable pendant plusieurs années chez la souris [21] et plusieurs mois chez les gros animaux [22] après injection et même après administration orale [23]. L'inconvénient majeur des vecteurs AAV est la difficulté de produire de tels vecteurs en lots cliniques et en grandes quantités.

HSV

Les vecteurs **Herpes simplex virus (HSV)** (virus à ADNdb, capacité d'insert $\leq 40\text{kb}$) sont des virus pathogènes humains ayant déjà probablement infecté 80% de la population. Le principal avantage de ces virus est leur grande capacité d'insert. Les vecteurs dérivés du virus de l'herpès simplex (HSV-1), après injection directe, ont la capacité d'infecter les neurones [24,25] et offrent un espoir de transfert de gène dans le cas des neuroblastomes [26].

Les principaux inconvénients des différents vecteurs viraux sont : la réponse immune qu'ils peuvent induire, les risques potentiels associés aux virus réplicatifs, et le manque de spécificité.

1.6 Les vecteurs non viraux

En parallèle de ces vecteurs viraux, des techniques de transfert de gène non virales sont développées : elles doivent conserver les avantages des vecteurs viraux (efficacité de transfection) tout en évitant leurs inconvénients (immunogénicité, insertion mutationnelle).

ADN nu

Cette technique consiste à transférer l'ADN thérapeutique nu sous forme de plasmide [27]. C'est la technique la plus directe de transfert de gène, elle est en particulier efficace dans la peau [28] et le muscle squelettique [29]. Wolff et al. ont montré que l'expression du transgène porté par un plasmide injecté seul dans le muscle squelettique de souris peut durer plusieurs mois [30]. On ne connaît encore pas à ce jour le mécanisme d'entrée de l'ADN nu dans les cellules de l'organe injecté *in vivo*.

Cette technique peut être utilisée dans le domaine de la production de protéines sécrétées [31] et de la vaccination. Depuis 1990, il a été montré dans de nombreux modèles animaux de maladies infectieuses ou de cancer que l'injection directe d'ADN plasmidique dans le muscle ou la peau permet la production d'antigènes protéiques *in situ* et l'induction de réponses immunitaires protectrices, humorales et cellulaires, sans l'aide d'adjuvants ([32] et voir paragraphe Vaccination). La vaccination constitue ainsi une des applications majeures de l'injection d'ADN nu. Bien que

l'ADN nu, en tant que molécule, ne provoque pas de réponse immunitaire spécifique, la présence sur les plasmides de séquences bactériennes riches en motifs CpG non méthylés favorise *in vivo* les réponses inflammatoires et immunitaires [33]. Ceci représente un avantage pour les applications de vaccination mais un inconvénient pour les traitements de maladies par thérapie génique.

Alors que l'injection d'ADN nu est une approche très prometteuse de transfert de gène dans le muscle ou la peau, elle ne peut être envisagée pour des approches systémiques (administration par voie intraveineuse) car l'ADN plasmidique nu, s'il n'est pas protégé des protéines du sérum subit une dégradation très rapide [34] et a une demie-vie plasmatique très courte [35]. De plus, malgré les résultats positifs de transfert de gène observés par injection d'ADN nu dans la peau ou le muscle les niveaux d'expression obtenus sont trop faibles pour produire un effet thérapeutique [36] pour des applications autres que vaccinales. C'est pourquoi, afin d'augmenter l'efficacité de transfection (*in vitro* ou *in vivo*), l'administration d'ADN nu est généralement assistée soit par des vecteurs chimiques soit par des techniques physiques.

Vecteurs chimiques

Des vecteurs chimiques ont également été développés pour s'affranchir des limites de taille des gènes thérapeutiques et des problèmes de toxicité rencontrés chez les virus.

L'ADN ou ARN d'intérêt est une macromolécule anionique et les membranes cellulaires sont globalement chargées négativement. Les répulsions électrostatiques limitent donc les contacts de l'acide nucléique avec les membranes plasmiques. Les vecteurs non viraux sont des molécules naturelles ou synthétiques, lipides cationiques ou polymères cationiques, formant avec l'ADN des particules appelées respectivement **lipoplexes** ou **polyplexes**.

Ces complexes, chargés positivement, favorisent le transfert d'ADN à l'intérieur des cellules [37]. Le mécanisme d'entrée des complexes dans les cellules n'est pas encore complètement élucidé. Le modèle le plus défendu est celui de la voie de l'endocytose [38–40]. Une autre théorie suggère que le complexe fusionne avec la membrane plasmique des cellules via des interactions électrostatiques et que cela permettrait l'entrée de l'ADN dans la cellule [41]. Le mécanisme d'entrée dans la cellule influe sur le relargage, le trafic intracellulaire et le temps de vie de l'ADN dans la cellule. L'endocytose est un procédé en plusieurs étapes comprenant une liaison avec la membrane cellulaire, une internalisation du complexe, la formation d'endosomes, la fusion avec les lysosomes et finalement la lyse. Le faible pH et la présence d'enzymes dans les endosomes et lysosomes entraîne une dégradation de l'ADN encapsulé et les complexes associés. L'ADN qui a échappé à ces dégradations doit ensuite se dissocier des complexes avant ou après son entrée dans le noyau. Cette entrée se fait vraisemblablement par les pores nucléaires ($\varnothing \approx 10\text{nm}$) ou pendant la division cellulaire [42].

Lipoplexes Les lipides cationiques sont constitués de trois domaines (figure 3) : une tête cationique qui permet la liaison à l'ADN, une ou plusieurs chaînes hydrophobes, un espaceur séparant les deux éléments.

Le premier lipide cationique synthétisé pour le transfert de gène est le bromure de dioléoyl-oxypropyl-triméthylammonium (DOTMA) [41] qui formulé avec de l'ADN et un phospholipide neutre (le plus courant étant le dioléoyl-phosphatidil-éthanoline ou DOPE) forme des lipoplexes capables de transférer des cellules *in vitro* avec une efficacité supérieure aux techniques antérieures (précipitation de l'ADN au phosphate de calcium par exemple) [43].

Depuis, de nombreux lipides ont été synthétisés avec le souci d'augmenter l'efficacité de transfert de gène *in vitro* (en absence et en présence de sérum) et *in vivo*, de diminuer la cytotoxicité,

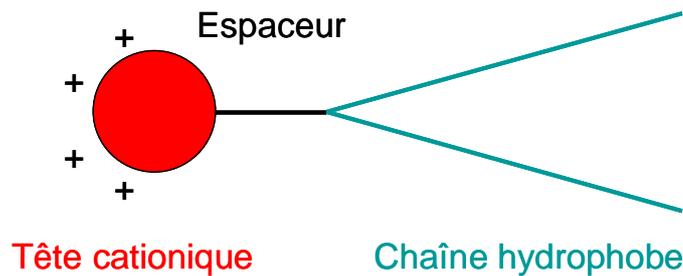


FIG. 3 – *Représentation schématique d'un lipide cationique.*

d'augmenter la stabilité des complexes en milieu biologique et d'ajouter éventuellement des éléments de ciblage cellulaire [44]. L'efficacité de transfection dépend du lipide cationique utilisé, du rapport de charge lipide/ADN, du type de cellules/tissus transfectés.

Polyplexes Les polymères cationiques comme la poly(L-lysine), la protamine, le polyéthylèneimine (PEI) ou encore les dendrimères cationiques s'associent à l'ADN via de multiples interactions électrostatiques. 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 étaient capables de condenser le plasmide et de former des complexes très efficaces pour le transfert de gènes *in vitro* dans différents types cellulaires et *in vivo* par voie topique ou systémique [45]. L'efficacité de transfection du PEI semble être liée à sa structure chimique : le PEI est en effet riche en groupements amines protonables au pH physiologique, il fonctionnerait donc dans les endosomes comme une éponge à protons ce qui entraînerait, outre la protection de l'ADN, une augmentation de la pression osmotique, favorisant ainsi la rupture de l'endosome et la libération de l'ADN qui peut alors atteindre le noyau [46].

Les vecteurs non viraux sont plus faciles à produire que les vecteurs viraux, leur qualité de production est plus constante. En revanche, l'obtention de complexes ADN/vecteur colloïdalement stables et dont les caractéristiques physico-chimiques sont constantes est difficile. Bien que légèrement immunogènes, la réponse immunitaire qu'ils déclenchent a pour conséquence de les éliminer mais n'est pas toxique pour l'organisme. L'inconvénient majeur de l'utilisation de ce type de vecteurs reste cependant que leur efficacité de transfection est encore bien inférieure à celle des vecteurs viraux.

Méthode physique

Une troisième approche consiste à utiliser une méthode physique ou mécanique telle que la microinjection, le canon à ADN, le laser, les ultrasons, l'injection hydrodynamique, l'électroporation ou électrotransfert (pour une revue détaillée, voir [9]).

Microinjection La microinjection consiste à injecter directement le matériel génétique dans le cytoplasme ou le noyau d'une cellule en utilisant une micropipette de verre, un système de précision pour contrôler le mouvement de la micropipette, un microinjecteur et un microscope. Le matériel génétique est introduit dans la cellule par la pression hydrostatique. Cette technique a été utilisée pour la première fois en 1980 [47] sur des cellules en culture. Par la suite, Gordon et al. ont utilisé cette technique pour produire des souris transgéniques [48, 49]. Cette technique est actuellement la méthode classique pour la production d'animaux transgéniques.

Cette technique est conceptuellement simple mais difficile à appliquer, en effet on ne peut traiter qu'une seule cellule à la fois. Cette technique n'est pas du tout applicable dans le cadre de la thérapie génique *in vivo* ni *ex vivo*.

Canon à ADN Cette technique consiste à bombarder à l'aide d'un canon à ADN (ou «gene gun») un tissu cible avec des particules d'or ou de tungstène recouvertes de l'ADN d'intérêt [50]. Les billes doivent avoir un diamètre plus petit que le diamètre de la cellule cible (en général 1-1,5 μ m). Cette technique a été utilisée pour la première fois en 1987 pour améliorer le transfert de gène dans les cellules de plantes [51]. Au début des années 1990 cette technique a été étendue aux cellules de mammifères et aux tissus vivants [52, 53]. A l'heure actuelle, cette technique est principalement utilisée pour l'immunisation génétique dans la peau [54].

Irradiation par laser Cette technique repose sur l'utilisation d'une source laser (par exemple un laser titane-saphir, un laser à argon ou un laser neodymium yttrium-aluminium-garnet (YAG)). Le faisceau laser est focalisé au niveau des cellules cibles grâce à une lentille. Le mécanisme pourrait s'expliquer par une perméabilisation transitoire de la membrane au niveau du faisceau laser probablement par un effet thermique local. Cette perturbation est suffisante pour permettre à l'ADN de pénétrer dans la cellule.

Les premiers résultats de transfert de gène obtenus par irradiation laser datent du début des années 80 [55]. Récemment, Zeira et al. ont démontré un transfert de gène efficace *in vivo* en utilisant un laser femtoseconde fonctionnant dans l'infrarouge, c'est-à-dire en utilisant des impulsions très brèves de l'ordre de 10^{-15} secondes [56]. L'inconvénient principal de cette technique est son coût élevé et l'infrastructure lourde qu'elle nécessite (taille physique de l'installation du laser).

Injection hydrodynamique Cette technique consiste à injecter très rapidement en intraveineux ou intraartériel un grand volume de liquide contenant l'ADN d'intérêt. Cette forte pression permet une pénétration de l'ADN en ciblant principalement les hépatocytes (injection dans la veine de la queue pour le ciblage du foie), ou les cellules musculaires (injection dans le système artériel pour cibler les muscles). Cette technique a surtout été développée chez la souris et le rat en utilisant le foie comme organe cible [57], mais des études récentes ont montré la faisabilité de cette technique sur de plus gros animaux en injection intraartérielle par l'intermédiaire de cathétères chez le singe et chien [58].

Sonoporation Cette technique consiste à appliquer des ultrasons pour perméabiliser les membranes des cellules et ainsi augmenter la pénétration de molécules. L'ADN nu est en général co-injecté avec des microbulles (1 à 3 μ m) constituées de protéines, lipides ou polymères et remplies d'air ou d'un gaz inerte. On peut citer par exemple les microbulles OptisonTM qui sont constituées de perfluoropropane encapsulé dans une sphère d'albumine humaine.

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

les sources de cavitation : la destruction de chaque microbulle crée une réaction en chaîne de cavitation [59].

Le premier résultat de transfert de gène par sonoporation a été décrit au milieu des années 90 [60]. Depuis cette technique a été utilisée dans une grande variété de tissus parmi lesquels le muscle squelettique [61], la tumeur solide [62] ou l'artère carotide [63].

Electrotransfert Cette technique consiste à appliquer un champ électrique au niveau du tissu cible après l'injection d'ADN. Cette technique fera l'objet du chapitre suivant.

Technique	Principe	Matériel	Avantages	Inconvénients
Microinjection	injection manuelle	micropipette, micromanipulateur, microscope	très efficace (ciblage direct du noyau)	fastidieux <i>ex vivo</i> et pas d'applications <i>in vivo</i>
Canon à ADN	bombardement de particules à grande vitesse	«gene gun», particules	immunisation génétique, faibles quantités d'ADN	faible pénétration dans les tissus profonds
Sonoporation	perméabilisation de la membrane cellulaire par des ultrasons	sonde à ultrasons, microbulles	nouvelles formulations de microbulles	toxicité mal établie
Irradiation laser	perméabilisation induite par un faisceau laser	source laser	efficace, haute précision du faisceau	coût élevé, toxicité potentielle
Injection hydrodynamique	injection directe d'un grand volume de liquide	seringue, (cathète)	ciblage efficace du foie	difficilement transférable à l'homme
Electrotransfert	champ électrique induisant une perméabilisation de la membrane et une force électrophorétique	électrodes, générateur d'impulsions	très efficace, facile d'utilisation (surtout pour la peau, le muscle et la tumeur)	toxicité potentielle

TAB. 2 – *Principales techniques physiques ou mécaniques de transfert de gène.*

2 Electrotransfert

Nous décrirons plus en détail cette technique que nous avons utilisé pour ce travail.

2.1 Historique

La membrane cellulaire est une barrière semi-perméable qui contrôle les échanges de molécules entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Seul un nombre limité de molécules hydrophobes peut pénétrer dans le cytoplasme en traversant la bicouche lipidique, d'autres doivent pénétrer par l'intermédiaire de systèmes de transport spécifiques. Mais la plupart des molécules hydrophiles sont incapables de pénétrer dans la cellule. Dans ce contexte, un des problèmes posés aux biologistes était de pouvoir faire traverser cette barrière naturelle par diverses macromolécules afin de les faire entrer dans la cellule.

En 1982, E. Neumann démontra pour la première fois que de l'ADN pouvait être introduit dans des cellules de souris en suspension grâce à des impulsions électriques [64]. Depuis cette technologie nommée électroporation ou électroperméabilisation a été développée pour être utilisée en

routine *in vitro* sur des cellules procaryotes et eucaryotes, dans des applications de biologie cellulaire ou de pharmacologie. L'électropéabilisation est une technique qui a pour effet de rendre les membranes cellulaires perméables temporairement par l'application d'impulsions électriques. L'optimisation des paramètres électriques permet de rendre cette perméabilisation transitoire et d'obtenir ainsi un bon taux de survie cellulaire [65].

2.2 Mécanisme de l'électrotransfert à l'échelle de la cellule

Depuis les années 80, la technique d'électroporation est utilisée pour le transfert d'acides nucléiques bien que le mécanisme exact ne soit pas totalement élucidé. Nous nous consacrerons essentiellement dans ce paragraphe aux études du mécanisme de l'électrotransfert d'ADN menées à l'échelle de la cellule. Nous verrons que deux phénomènes essentiels interviennent : (1) la perméabilisation de la cellule aux petites molécules indiquant une déstabilisation de la membrane et (2) le transport de l'ADN par électrophorèse.

Perméabilisation

Les conséquences de l'exposition d'une cellule à des impulsions électriques ont été largement étudiées. La bicouche lipidique de la membrane plasmique est faiblement conductrice et sépare deux solutions ayant une très forte conductivité ionique, le cytoplasme d'une part et le milieu extracellulaire d'autre part. La membrane se comporte électriquement comme un diélectrique et l'ensemble, milieu externe, membrane isolante, cytoplasme, se comporte comme un condensateur (figure 4).

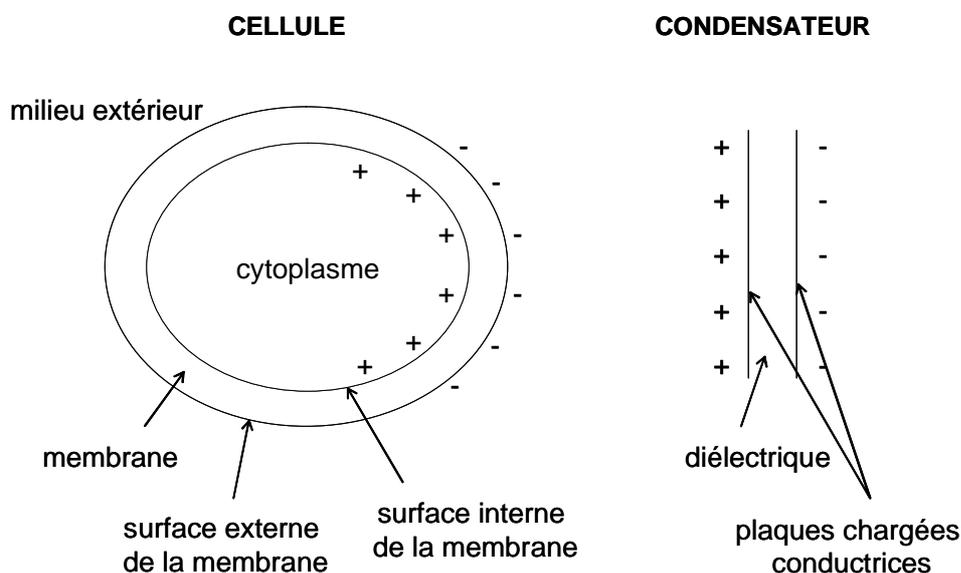


FIG. 4 – *Analogie entre une cellule et un condensateur.*

La différence de potentiel entre la membrane externe et la membrane interne d'une cellule $\Delta\Psi_0$ est de l'ordre de 70mV. Lorsqu'un champ électrique externe est appliqué à une cellule, le courant résultant induit une accumulation de charges électriques sur la membrane cellulaire et module ainsi le potentiel transmembranaire de la cellule. Si le potentiel transmembranaire dépasse une valeur seuil, la membrane cellulaire se désorganise et des changements structuraux apparaissent.

La différence de potentiel transmembranaire $\Delta\Psi_i$ induite par un champ électrique est décrite par l'équation de Schwann :

$$\Delta\Psi_i = F.g(\lambda).r.E.\cos\theta.(1 - \exp(-t/\tau)) \quad (1)$$

où F est un facteur dépendant de la forme de la cellule, $g(\lambda)$ un paramètre dépendant de la conductivité λ de la membrane, r le rayon de la cellule, E le champ appliqué, θ l'angle entre la direction du champ et la normale à la tangente au point considéré sur la membrane, t la durée d'application du champ électrique et τ le temps de charge de la cellule. Si on considère que la membrane est un diélectrique pur, alors le terme $g(\lambda)$ devient égal à 1. Dans les conditions utilisées pour l'électroperméabilisation des cellules, la durée des impulsions est grande (de plusieurs centaines de microsecondes à quelques millisecondes) devant le temps de charge de la cellule qui est de l'ordre de quelques microsecondes. L'équation peut alors être simplifiée :

$$\Delta\Psi_i = F.r.E.\cos\theta \quad (2)$$

Donc $\Delta\Psi_i$ n'est pas uniforme à la surface de la cellule : le potentiel transmembranaire induit est maximum aux points de la cellule face aux électrodes ($\theta = 0$ et π). Ce phénomène a été observé expérimentalement par vidéomicroscopie.

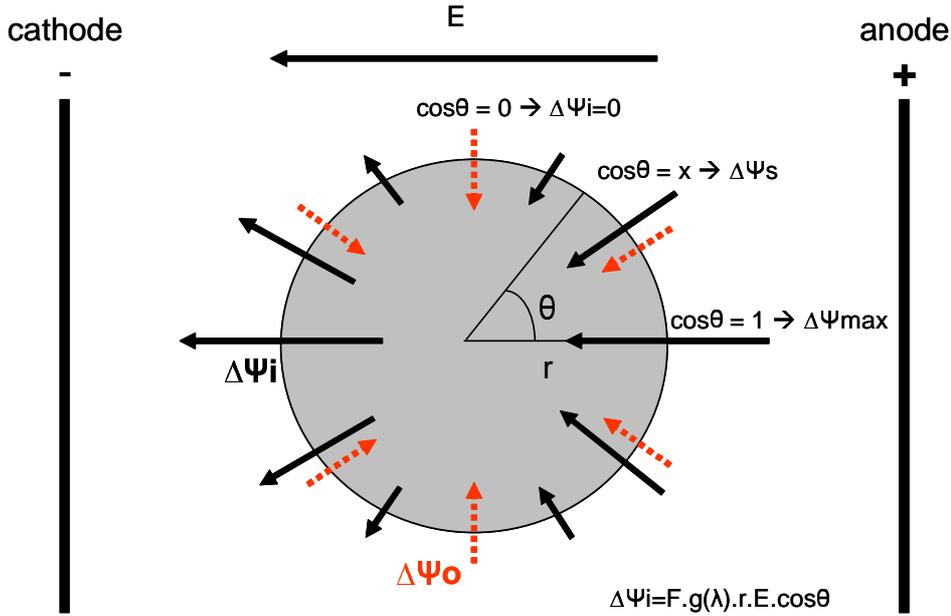


FIG. 5 – *Conséquences de l'exposition d'une cellule à des impulsions électriques.* Abréviations : r : rayon de la cellule, E : Intensité du champ électrique (V/cm), θ : angle entre la direction du champ électrique et la normale à la tangente de la membrane de la cellule au point considéré, F : facteur de forme de la cellule, $g(\lambda)$: paramètre dépendant de la conductivité de la membrane.

La membrane est mise hors équilibre et devient transitoirement perméable lorsque la somme :

$$\Delta\Psi_0(\text{cellule}) + \Delta\Psi_i(\text{induite}) \quad (3)$$

atteint une valeur seuil $\Delta\Psi_s$, voisine de 200mV [66,67]. La caractéristique majeure de l'électroperméabilisation est l'existence de cette valeur seuil de différence de potentiel transmembranaire

$\Delta\Psi_s$. La valeur $\Delta\Psi_s$ étant globalement la même pour les membranes biologiques (200-300mV), cela signifie que la valeur seuil du champ électrique nécessaire pour obtenir une perméabilisation de la membrane (E_s) est inversement proportionnelle aux paramètres de forme et de taille de la cellule considérée. Ainsi pour des cellules eucaryotes en culture (\varnothing 10 à 30 μ m) E_s est de l'ordre de 1000V/cm, et de l'ordre de 6000V/cm pour des bactéries (E.coli \varnothing 1 à 5 μ m).

Lorsque la valeur du champ électrique seuil est dépassée, plus la différence entre la valeur seuil et la valeur appliquée est grande, plus la surface perméabilisée est étendue. En effet l'équation 2 montre que pour un champ électrique donné, la différence de potentiel transmembranaire induite varie en fonction du point considéré sur la membrane. Plus l'angle formé entre la direction du champ et la direction perpendiculaire à la tangente au point considéré augmente, plus le potentiel transmembranaire induit diminue. Au delà d'un angle donné, $\Delta\Psi_i$ devient inférieur à la valeur seuil permettant la perméabilisation. La relation entre le champ électrique appliqué et la surface perméabilisée a été mise en évidence *in vitro* par marquage fluorescent des zones perméabilisées de la cellule [68]. Ces travaux ont aussi montré que c'est d'abord la face de la cellule du côté anode qui est perméabilisée, le potentiel de membrane négatif de la cellule s'ajoutant à celui créé.

Transfert d'ADN

Les mécanismes moléculaires du transfert d'ADN lors de l'électroperméabilisation sont encore mal élucidés. Différents modèles ont été proposés :

Un modèle suggère que l'électroperméabilisation conduit à la formation d'«électropores» relativement stables [64,69]. L'ADN plasmidique pourrait éventuellement passer la membrane après une étape de liaison à la surface de la cellule puis par diffusion. Cependant ces pores n'ont jamais pu être visualisés.

Une autre théorie suggère que l'ADN plasmidique passe la membrane pendant l'application des impulsions électriques, et ceci grâce à des forces électrophorétiques associées au champ électrique. Cet effet électrophorétique a été montré lors de différentes études : Klenchin et al. ont démontré la nécessité de la présence de l'ADN au moment de l'application du champ électrique [70]. De plus ils ont montré que l'efficacité de transfection dépendait de la polarité du champ électrique. Sukharev et al. ont également montré que des impulsions de courte durée à haut voltage (HV) induisaient une perméabilisation de la membrane mais pas de transfection, des impulsions de longue durée à bas voltage (LV) n'induisaient également aucune transfection par contre la séquence HV puis LV permettait d'obtenir une transfection. Une hypothèse proposée était que la transfection des cellules perméabilisées par HV n'était possible que si on induisait une électrophorèse de l'ADN avec LV [71].

Une étude par microscopie de fluorescence à l'échelle de la cellule [72] a révélé que des impulsions électriques de l'ordre de la milliseconde induisaient une interaction entre la membrane électroperméabilisée et l'ADN. Une accumulation de plasmide fluorescent a été observée au contact de la membrane cellulaire côté cathode sans pour autant immédiatement se déplacer dans le cytosol. Ainsi l'ADN doit être présent pendant les impulsions et l'électrophorèse induite par le champ favorise son insertion dans la membrane, mais l'ADN ne franchit la membrane électroperméabilisée que dans la minute suivante [73]. Le même groupe a récemment démontré la relation directe entre l'interaction ADN/membrane et l'efficacité de transfection : une augmentation de la surface de contact entre l'ADN et la membrane conduit à une plus forte expression [74].

2.3 Mécanisme de l'électrotransfert *in vivo*

Ce n'est qu'au début des années 90 que les premières études d'électroporation *in vivo* apparaissent. Elles concernent tout d'abord le transfert de molécules chimiques et non d'ADN. La première réelle démonstration de l'électroperméabilisation sur des cellules d'un tissu *in vivo*, fut réalisée sur des tumeurs après injection de bléomycine [75] et application d'impulsions électriques. La bléomycine est un agent anticancéreux qui provoque des cassures simple et double-brin de l'ADN entraînant une toxicité cellulaire. L'efficacité de la bléomycine dépend de sa concentration intracellulaire mais cette drogue pénètre mal dans les cellules. Il a donc été observé une meilleure pénétration de la bléomycine après application d'impulsions électriques aux tumeurs, conduisant à une plus forte toxicité. Depuis cette technique a été développée sous le nom d'électrochimiothérapie [75,76]. On peut citer par exemple l'utilisation du cisplatine, un autre agent anticancéreux, pour un essai clinique sur des mélanomes malins de la peau [77] ou pour un usage vétérinaire sur des chevaux [78].

A la fin des années 90, l'électrotransfert *in vivo* voit le jour en parallèle de cette technique d'électrochimiothérapie. Cette technique efficace de transfert de gène consiste à injecter une solution d'ADN dans le tissu cible et à appliquer une série d'impulsions électriques sur ce même tissu.

De la même façon que pour les études *in vitro*, le mécanisme de l'électrotransfert d'ADN *in vivo* n'est pas complètement élucidé. La plupart des études tendent à montrer que le mécanisme de l'électrotransfert *in vivo* est comparable au mécanisme *in vitro* décrit précédemment et étendu à l'ensemble du tissu : la perméabilisation est atteinte au delà d'une valeur seuil de champ local, et l'électrotransfert est un mécanisme faisant intervenir plusieurs étapes.

En 1999, Mir et al. ont montré que des impulsions électriques permettaient d'augmenter le transfert de gène dans le muscle squelettique non seulement par un effet de perméabilisation de la cellule mais également par un effet direct sur l'ADN permettant sa migration et son entrée dans la cellule [76]. Ils ont étudié d'une part l'incorporation du $^{51}\text{Cr-EDTA}$ radioactif, comme marqueur de la perméabilisation des fibres musculaires, et d'autre part l'expression du transgène, comme preuve de l'entrée d'ADN. Ils ont montré que l'ajout de $^{51}\text{Cr-EDTA}$ peu de temps après les impulsions électriques permettait la pénétration du marqueur radioactif alors que l'ajout d'ADN après les impulsions électriques ne permettait plus l'entrée de l'ADN.

Bureau et al. ont également montré que l'électrotransfert était la combinaison de deux phénomènes : un effet électroperméabilisant sur la cellule et électrophorétique sur l'ADN [79]. Pour montrer cela ils ont étudié le transfert de gène sur le muscle squelettique de souris en combinant d'une part des impulsions électriques de faible voltage (LV, non perméabilisantes) mais de longue durée (effet électrophorétique) et d'autre part des impulsions électriques de haut voltage mais de courte durée (HV, perméabilisantes). Seule la combinaison d'une impulsion HV (800V/cm ; 0,1ms) suivie d'une impulsion LV (80V/cm, 80ms) a conduit à un transfert de gène élevé. Une étude plus récente a confirmé que le rôle des impulsions HV est limité à la perméabilisation de la cellule, alors que celui des impulsions LV est limité à l'effet électrophorétique sur l'ADN [80].

De façon plus précise, une étude par imagerie par RMN a montré que lorsque le muscle est soumis à une série d'impulsions électriques efficaces pour le transfert de gène, la zone de perméabilisation (visualisée par un complexe au gadolinium Gd-DTPA, un agent de contraste) était superposable à la zone d'expression d'un plasmide codant la β -galactosidase [81].

Il faut noter que dans toutes ces expériences, ce qui est mesurée est une perméabilisation à de petites molécules et non à l'ADN. Il est donc peut-être plus pertinent de parler de déstabilisation de la membrane cellulaire.

La déstabilisation de la membrane cellulaire et l'effet électrophorétique sur l'ADN ne sont

sans doute pas les seuls mécanismes contribuant au transfert de l'ADN dans la cellule. Par exemple, Rols et al. ont évoqué l'importance de métabolismes énergétiques (ADP et ATP) pour le passage de l'ADN à travers la membrane et sa migration jusqu'au noyau [82]. Satkauskas et al. ont également proposé un mécanisme de transport de l'ADN par endocytose médié par un récepteur, mais ce mécanisme ne peut pas expliquer l'électrotransfert [83]. Dans cette même étude, ils ont montré que le niveau d'expression du gène d'intérêt était maintenu en appliquant les impulsions jusqu'à 4 heures après l'injection d'ADN, bien que d'autres études aient montré que la plupart de l'ADN injecté est éliminé au bout de 4 heures [84].

Il a été confirmé au laboratoire qu'après une injection intramusculaire, la majeure partie de l'ADN est rapidement dégradée et éliminée. Une infime partie de l'ADN est préservée et constituerait un réservoir d'ADN électrotransférable et stable [85].

Les mécanismes moléculaires de l'électrotransfert d'ADN *in vivo* sont encore à l'heure actuelle en cours d'investigation. C'est très vraisemblablement un mécanisme multi-étapes faisant intervenir suite à l'injection d'ADN : distribution de l'ADN, perméabilisation de la cellule, transfert d'ADN facilité par un effet électrophorétique. Cependant il est encore nécessaire de comprendre les détails et les contributions de chaque étape pour développer des stratégies d'électrotransfert plus efficaces.

2.4 Réalisation pratique

Une solution saline d'ADN plasmidique est injectée dans le tissu cible et des impulsions électriques sont appliquées grâce à deux électrodes (principalement aiguilles ou plaques) placées de part et d'autre du site d'injection et connectées à un générateur d'impulsions (figure 6). Cette technique a été largement utilisée dans un grand nombre de tissus avec une augmentation nette de l'expression de gène comparée à une injection seule.

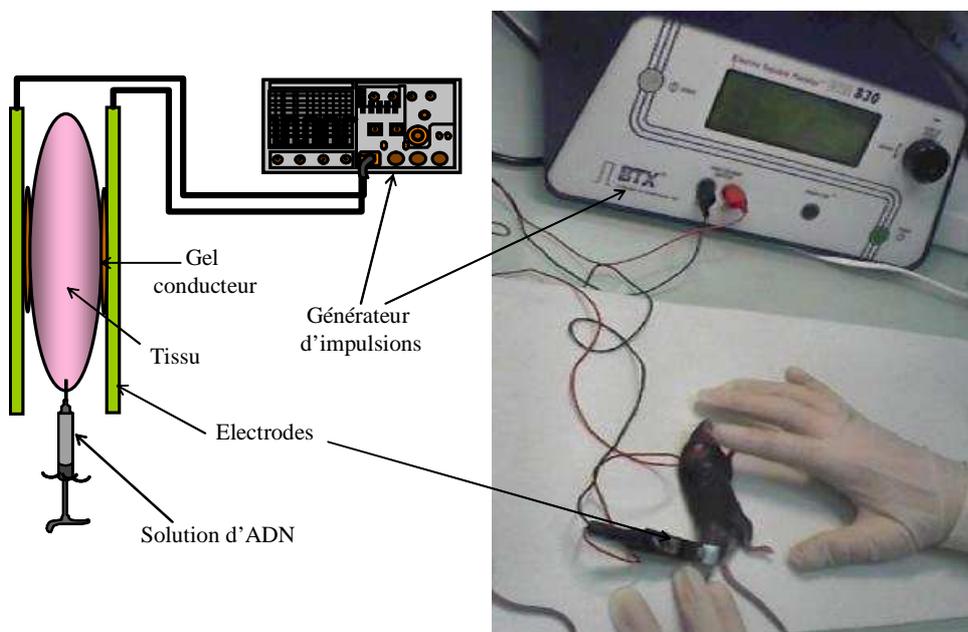


FIG. 6 – Réalisation pratique de l'électrotransfert.

Choix des électrodes

Le choix des électrodes dépend du tissu cible et de la taille de l'animal traité. Dans tous les cas, le type d'électrodes est d'une importance critique et doit être mûrement réfléchi. Lors d'un électrotransfert sur petit animal dans un tissu tel que le muscle squelettique, une tumeur ou le foie, la majorité des expérimentateurs utilisent des électrodes composées de deux plaques attachées à une pince. En effet ce type d'électrode peut être facilement appliqué en externe de chaque côté du tissu d'intérêt. Pour des animaux de plus grosse taille, les électrodes aiguilles sont plus souvent utilisées, car les électrodes plaques nécessiteraient un champ électrique trop fort (du fait de l'écart important entre les électrodes). Dans le cas des électrodes aiguilles, il peut s'agir de deux aiguilles ou d'un réseau d'aiguilles permettant des sites d'injection et d'électroporation multiples.

Conditions électriques

Plus précisément, la connaissance de l'intensité et de la distribution du champ électrique est très importante, pour obtenir d'une part un transfert de gène efficace mais également une toxicité réduite. La distribution du champ électrique dépend du tissu et du type d'électrodes entraînant ainsi une variation de l'intensité effective du champ (en V/cm) dans la zone traitée. La distribution du champ électrique est plus homogène pour des électrodes plaques que pour des électrodes aiguilles, et, pour un voltage identique, le champ électrique obtenu est plus faible pour des électrodes aiguilles que pour des électrodes plaques (figure 7) [86].

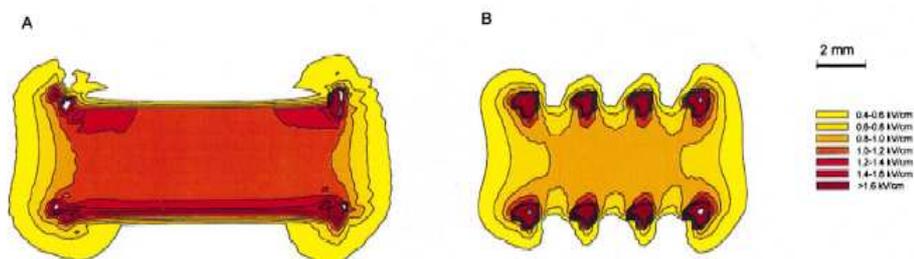


FIG. 7 – *Calcul de la distribution du champ électrique pour des électrodes plaques (A.) ou aiguilles (B.) pour un champ de 1200 V/cm. Figure réalisée par Gehl et al. [86].*

Pour chaque tissu et chaque espèce, il est nécessaire de déterminer les valeurs seuil du champ électrique : seuil réversible (perméabilisation) et seuil irréversible (dommage cellulaire) pour obtenir les conditions électriques optimales pour un transfert de gène avec le minimum d'effets toxiques. Dans ce contexte, Miklavcic et al. ont développé un modèle combinant des prédictions numériques et des observations expérimentales pour déterminer ces valeurs seuil dans le cas d'électrodes aiguilles pour délivrer des drogues dans le foie de rat [87].

Choix des impulsions Différents types d'impulsions électriques peuvent être appliquées : les impulsions exponentielles sont souvent utilisées pour des essais sur des cellules *in vitro*. Dans ce cas, la constante de temps dépend de la capacité et de la résistance du milieu. Les impulsions carrées sont plutôt utilisées pour des essais *in vivo* car ainsi le voltage et la durée des impulsions peuvent être réglés indépendamment de la résistance électrique du tissu.

Protocoles Un des avantages de l'électrotransfert d'ADN est la possibilité d'adapter le protocole électrique à différents tissus. Divers protocoles ont été publiés par différents groupes : des impulsions de faible voltage (100-300V) mais de longue durée (4-50ms) pour des essais sur des mélanomes [82] ou le muscle [88] par exemple, ou des impulsions de haut voltage (400-1200V/cm) mais de courte durée (95-300 μ sec) dans le foie [89], les tumeurs [90] ou le muscle [91]. Les paramètres électriques dépendent à la fois de la méthodologie employée et des caractéristiques électriques des tissus cibles : ceci permet une grande diversité de protocoles (tableau 3).

espèce	électrodes	conditions	gène	Ref.
souris	plaque	200V/cm ; 8 p. ; 20ms ; 1-2Hz	Luc, hSeAP, hFIX	[76, 92]
	plaque	200V/cm ; 6 p. ; 20-50ms ; 1Hz	Luc, LacZ	[93]
	plaque	130V/cm ; 6 p. ; 60ms ; 10Hz	Luc, LacZ	[94]
	aiguilles	90V/cm ; 1000p. bipolaires ; 10 trains ; 1s	Epo, hSeAP	[84]
rat	aiguilles	200V/cm ; 8 p. ; 50ms	Epo	[95]
lapin	6-aiguilles	200V/cm ; 6p. ; 50ms ; 1Hz	HBsAg	[96]
cochon d'inde	6-aiguilles	200V/cm ; 6 p. ; 50ms ; 1Hz	HBsAg	[96]
cochon	aiguille/plaque	100-200V/cm ; 6 p. ; 60ms ; 1Hz	SeAP, GHRH	[97]
	6-aiguilles	200V/cm ; 6 impuls. bipolaires ; 20ms ; 5Hz	HBsAg	[98]
mouton	aiguilles	150-200V/cm ; 1000 p. ; 200 μ s ; 10 trains ; 1s	GFP	[99]
chèvre	aiguilles	150-200V/cm ; 1000 p. ; 200 μ s ; 5-10 trains ; 2s	MPB70, Ag85B, Hsp65	[100]
vache	aiguilles	150-200V/cm ; 1000 p. ; 200 μ s ; 5-10 trains ; 2s	MPB70, Ag85B, Hsp65	[100]
macaque	6-aiguilles	200V/cm ; 6 p. ; 50ms ; 1Hz	HIV-1 gag, env	[101]

TAB. 3 – *Diversité de protocoles d'électrotransfert dans le muscle.* Notations : p. : impulsions. Pour les abréviations, se reporter à la liste des abréviations .

Toxicité

Les conditions optimales de l'électrotransfert d'ADN dans un tissu donné, résultent d'un compromis entre l'efficacité du transfert d'ADN et une toxicité minimale au niveau cellulaire. La toxicité fait intervenir différents paramètres mais la perméabilisation est le principal puisque le milieu extérieur diffuse dans les cellules et modifie la composition du milieu interne. On peut également observer une sortie du milieu interne hors de la cellule. Ce paramètre de toxicité peut être réduit quand la durée et le niveau de perméabilisation sont minimaux.

Un autre facteur de toxicité est le stress oxydatif dû à la génération de radicaux libres induite près de la membrane électroporeabilisée [65].

De plus il a été montré sur le muscle, que l'électrotransfert induisait des lésions du muscle dépendantes de la quantité d'ADN injectée avec l'apparition de myofibrilles nécrotiques. Cependant 56 jours après le traitement, les muscles électrotransférés étaient à nouveau indistingables des muscles contrôles [102]. Une autre étude récente confirme ce résultat, suggérant que les dommages associés à l'électrotransfert étaient principalement dus à la présence et à l'expression intracellulaire de plasmide [103].

Récemment, Bertrand et al. ont montré avec des souris transgéniques exprimant un transgène sous le contrôle d'un promoteur muscle spécifique, que les altérations phénotypiques et morphologiques des fibres musculaires dues à l'électrotransfert étaient très transitoires. Cependant le procédé conduit à des altérations profondes, mais là encore transitoires, du statut de transcription [94]. Dans le cas des fibres musculaires, sept à dix jours semblent nécessaires pour retrouver un état physiologique normal.

Une étude moléculaire de la réaction des cellules musculaires à l'application de champs électriques a été réalisée au laboratoire (thèse de Anne Rübenstrunk) : l'étude des profils d'expression sur des puces à ADN (Atlas Mouse Stress/Toxicology Array) nous a permis de constater que l'application de champs électriques optimisés pour le transfert de gène n'induisait pas l'expression de gènes marqueurs de stress et de la réponse toxique dans les cellules [104]. Ceci montre au niveau moléculaire que la technique d'électroporation n'est pas toxique pour les cellules choquées. Dans le cadre de ce projet, nous avons récemment réalisé une étude plus précise de l'état des muscles sur des souris C57Bl/6 après un, deux ou trois électrotransferts (avec une injection d'ADN uniquement lors du premier électrotransfert). Des analyses histologiques de coupes de muscles 15 jours ou 30 jours après traitement ont été réalisées par le Dr. Jean-Michel Caillaud de la Société Biodoxis (figure 8).

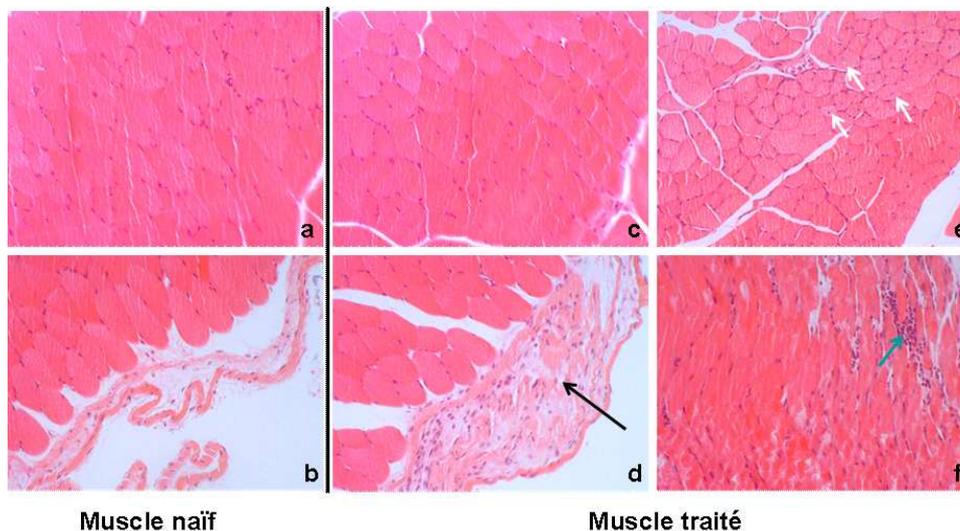


FIG. 8 – *Coupes histologiques de muscles de souris C57Bl/6 après un, deux ou trois électrotransferts.* Détail de quelques coupes : a., b. : muscle naïf ; c : muscle après 3 électrotransferts ; d : lésions inflammatoires subaigües minimales ou discrètes au niveau de la gaine conjonctive périmusculaire (flèche noire, 3 électrotransferts, après 30 jours) ; e : cellules musculaires avec centralisation nucléaire (flèches blanches, 1 électrotransfert, après 15 jours) ; f : lésions inflammatoires subaigües discrètes intramusculaires chez une souris (flèche verte, 1 électrotransfert, après 15 jours).

La conclusion de cette étude est que très peu de lésions musculaires sont observées (figure 8 c), les rares cellules musculaires avec centralisation nucléaire observées dans quelques muscles ne sont pas significatives (figure 8 e), il n'y a pas de lésion vasculaire ou nerveuse, seules quelques lésions inflammatoires subaiguës minimales ou discrètes sont observées au niveau de la gaine conjonctive périmusculaire (figure 8 d) ou en intramusculaire chez une souris (figure 8 f). On peut supposer que les lésions inflammatoires au niveau de la gaine conjonctive périmusculaire observées sur les muscles traités une et trois fois sont dues à l'inhomogénéité de la distribution du champ entre les électrodes ([87] et paragraphe précédent).

Biodistribution du plasmide

Différentes études ont montré l'importance de l'accessibilité de l'ADN aux cellules cibles. Ces études, réalisées principalement sur le muscle squelettique, ont montré qu'améliorer la distribution du plasmide conduisait à une augmentation de l'expression. Une meilleure distribution peut être obtenue par exemple par la préinjection d'une solution de sucrose qui crée des espaces entre les fibres musculaires [36], ou encore avec un prétraitement à la hyaluronidase [105], une enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique, un constituant majeur de la matrice extracellulaire [106]. Par exemple, Molnar et al. ont montré par histochimie en utilisant le gène LacZ, une augmentation de la zone du muscle transfectée de 150 à 370% grâce à un prétraitement à la hyaluronidase avant l'électrotransfert (175V/cm) dans différentes souches de souris [107] (voir aussi chapitre 1). Il est intéressant de noter que ce prétraitement à la hyaluronidase permet d'utiliser, pour un même niveau d'expression, des voltages plus faibles tout en réduisant les dommages musculaires [108]. Le poly-L-glutamate a également été utilisé dans le muscle de souris pour augmenter l'expression d'un transgène : en effet, le poly-L-glutamate est un polymère anionique qui semble augmenter l'internalisation du plasmide à l'intérieur de la cellule et/ou réduire sa dégradation [109].

2.5 Tissus cibles

L'électrotransfert *in vivo* apparaît comme une technique simple et efficace de transfert de gène. Au cours de ces dernières années, cette technique a été employée sur une large variété de tissus incluant muscle squelettique, peau, foie, poumons, rein, articulations, cerveau, rétine, cornée, et bien d'autres encore (tableau 4). Différentes conditions d'électrotransfert sont appliquées selon le tissu cible car le transfert de gène est hautement dépendant de l'organisation du tissu et de la taille des cellules transfectées. Nous ne détaillerons dans les paragraphes suivants que le muscle squelettique et la peau, organes que nous avons utilisés au cours de cette thèse.

Muscle squelettique

L'électrotransfert d'ADN dans le muscle squelettique a été découvert de façon indépendante par trois équipes [76, 140–142]. Le muscle squelettique est le tissu cible le plus largement utilisé pour l'électrotransfert car il offre de nombreux avantages :

- il constitue un large volume facilement accessible,
- le muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires. Les fibres musculaires sont des cellules très allongées et organisées en fibres parallèles : de nombreuses fibres auront ainsi une orientation optimale par rapport au champ et pourront être transfectées sur toute la longueur,
- contrairement aux autres cellules de l'organisme, les cellules musculaires possèdent plusieurs noyaux plaqués contre la membrane cellulaire ce qui facilite le transfert de gène [143],

tissu	espèce	gène	Ref.
muscle			voir tableau 3
peau	rat	EPO	[110]
	souris	Luc, LacZ	[111]
	souris	Luc, GFP	[112]
tumeur	rat	LacZ	[90]
	souris	LacZ	[82]
	souris	Luc	[113]
	souris	Luc, LacZ	[92]
	rat	Luc	[114]
	souris	MBD2/déméthylase	[115]
foie	rat	GFP	[116]
	rat	Luc	[89]
	souris	Luc, LacZ	[117]
poumon	souris	Luc, LacZ	[118]
cartilage	rat	Luc	[119]
	rat	GFP	[120]
embryons	souris, poulet	LacZ	[121]
	poulet	GFP	[122]
rein	rat	LacZ, Luc	[123]
cerveau	souris, poulet	GFP	[124]
	souris	GFP	[125]
	xénope	GFP	[126]
	abeille	GFP	[127]
artère carotide	lapin	Luc	[128]
testicules	souris	CAT, Luc, LacZ	[129]
ovaires	souris	LacZ	[130]
cornée	souris	IL-6	[131]
	rat	GFP	[132]
rétine	rat	GFP	[133]
	souris, rat	GFP	[134]
tissu conjonctif	lapin	MMP-3	[135]
cordon médullaire	rat	GFP	[136]
rate	souris	Luc, GFP, hSeAP, IFN γ	[137]
vessie	rat	Luc, GFP, récepteur muscarinique	[138]

TAB. 4 – *Tissus cibles de l'électrotransfert.*

- les fibres musculaires ont une longue durée de vie, car les cellules ne se divisent pas ce qui permet potentiellement une expression à long terme en l'absence de régénération due à une blessure ou une réponse immunitaire cytotoxique [76] (voir Chapitre 4),
- outre les fibres musculaires et le tissu conjonctif qui le constituent, le muscle est parcouru par des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. Il possède ainsi une vascularisation

développée ce qui permet aux protéines produites d'atteindre rapidement la circulation sanguine (pour une revue voir [144]).

Pour toutes ces raisons, le muscle squelettique est une cible de choix pour le transfert de gène. Nous avons par exemple injecté et électrotransféré $10\mu\text{g}$ de plasmide pEGFPC1 dans le muscle tibial cranial d'une souris et visualisé, trois semaines après l'injection, les coupes des fibres musculaires au microscope à fluorescence (figure 9).

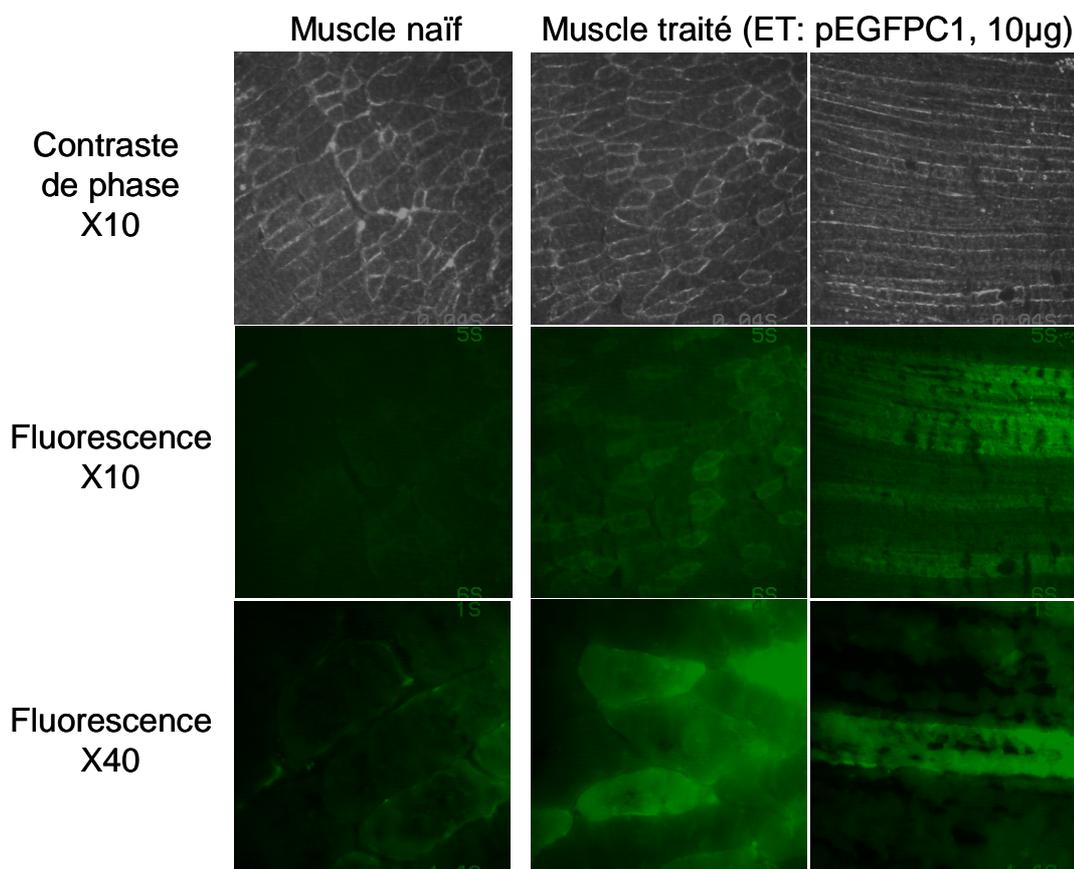


FIG. 9 – *Visualisation des fibres musculaires fluorescentes.* Les muscles sont injectés et électrotransférés avec $10\mu\text{g}$ de plasmide pEGFPC1 dans le muscle tibial cranial. En contrôle, un muscle naïf non traité est visualisé. Les photos sont prises avec un objectif X10 ou X40.

On observe un grand nombre de fibres fluorescentes et cette fluorescence est uniforme tout le long de la fibre (voir également les photos de muscle du chapitre 1).

La persistance de l'ADN à un état épisomal pendant des mois (voir chapitre 4) et la capacité du muscle squelettique à sécréter des protéines permet d'utiliser ce tissu pour des cinétiques d'expression à long terme. De nombreuses études ont montré une production à long terme de protéines sécrétées par le muscle : on peut citer par exemple la phosphatase alcaline sécrétée humaine (hSeAP), le facteur IX humain [145] sur des souris SCID, l'érythropoïétine [146], ou même des immunoglobulines [147] sur des souris immunocompétentes.

Peau

La peau est également un tissu intéressant pour le transfert de gène pour plusieurs raisons :

- c'est un tissu facilement accessible *in vivo* et une large surface de tissu peut être traitée,
- les kératinocytes au niveau de l'épiderme sont capables de synthétiser et de sécréter des protéines thérapeutiques qui atteignent la circulation sanguine. Fakharzadeh et al. ont par exemple montré que des souris initialement knock-out pour le facteur VIII (hémophilie A) et modifiées par transgénèse pour exprimer ce facteur VIII sous contrôle d'un promoteur spécifique de l'épiderme (involucrine), étaient ainsi capables de corriger leur défaut de coagulation [148],
- la peau, de par sa fonction naturelle de barrière biologique, est un organe de choix pour la vaccination par ADN car elle contient des cellules présentatrices d'antigène,
- les cellules de l'épiderme ont une courte durée de vie ce qui peut être utile pour des traitements qui nécessitent une durée d'expression brève, comme la vaccination par ADN par exemple.

Cependant, la peau ayant pour fonction principale la protection de l'organisme contre des agressions externes, elle possède une structure élaborée [149], qui ne facilite pas le transfert de gène. En particulier, la couche supérieure, *stratum corneum* ou couche cornée, constitue la plus importante barrière au transfert de gène [150, 151]. Différentes méthodes physiques de transfert de gène ont donc été développées (pour une revue, voir [152]) comme par exemple l'injection en intradermique d'ADN nu, le «gene gun» ou pistolet à ADN, ou le «skin patch». Parmi ces techniques, l'électrotransfert *in vivo* apparaît comme une technique efficace pour améliorer ce transfert de gène [153]. Dujardin et al. ont démontré que des impulsions carrées ou exponentielles induisaient des effets modérés et réversibles sur la peau, sans inflammation et nécrose, tout en perméabilisant de façon transitoire la peau permettant ainsi le passage de molécules [154]. L'électrotransfert permet d'améliorer considérablement le transfert de gène dans la peau par rapport à une injection seule avec un niveau d'expression élevé [111, 112]

3 Applications thérapeutiques de l'électrotransfert

3.1 Sécrétion ectopique de protéines

De nombreuses études avec des gènes rapporteurs ont montré le potentiel de l'électrotransfert intramusculaire pour la sécrétion à des niveaux thérapeutiques de protéines dans la circulation sanguine. Le transfert de gène présente une alternative intéressante à l'administration répétée de protéine recombinante : l'avantage dans ce cas est une meilleure pharmacocinétique parce que la protéine est sécrétée de façon stable (figure 10). Le muscle squelettique est un bon candidat en tant que tissu néoendocrine pour l'expression de cytokines, de facteurs de croissance, de facteurs de coagulation [92, 146]. Nous citerons dans ce paragraphe différentes études illustrant ce point.

Deux groupes ont récemment montré que la sécrétion d'érythropoïétine (Epo) après électrotransfert dans le muscle d'un plasmide codant le gène de l'Epo sous contrôle d'un promoteur CMV ou d'un promoteur sensible à la tétracycline Tet-On conduisait à une meilleure érythropoïèse, à une augmentation de la demie-vie des globules rouges et à un hémocrite élevé pendant plusieurs mois chez des souris β -thalassémiques [155, 156]. L'anémie liée à un défaut rénal est également une cible potentielle de thérapie génique par transfert du gène de l'Epo [110].

Le muscle squelettique a été utilisé pour la production de cytokines qui conduit à une augmentation de la survie dans un modèle expérimental viral de myocardite chez la souris [157] ou chez le rat [158]. La cytokine anti-inflammatoire IL-10 a montré des propriétés intéressantes dans un modèle d'athérosclérose [159]. La sécrétion par le muscle du HGF (Hepatocyte Growth Factor) a montré chez la souris sur un modèle expérimental d'inflammation aigüe du foie (administration de tétrachlorure de carbone), un effet protecteur au niveau des cellules du foie [160]. Un autre

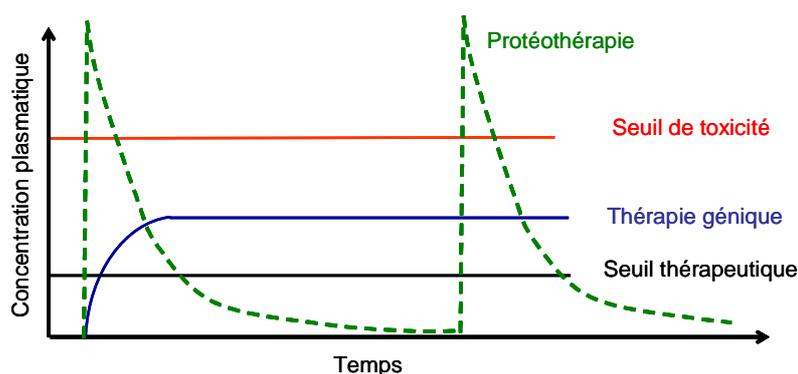


FIG. 10 – *Principe de la sécrétion ectopique de protéines : avantage pharmacocinétique.* .

résultat prometteur a été obtenu avec une protection contre le diabète autoimmun grâce à la sécrétion par le muscle d'un ligand de l'antigène cellulaire T (CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4), un régulateur négatif de l'activité des lymphocytes T [161]. Enfin, un groupe a montré que l'électrotransfert dans le muscle d'un plasmide codant le facteur VIII conduisait à une correction phénotypique de l'hémophilie A [162].

La potentialité de l'électrotransfert a été illustrée dans un modèle d'arthrite rhumatoïde chez la souris, l'arthrite induite au collagène (CIA). En effet, l'électrotransfert de plasmides codant les cytokines IL-10 et IL-4 protège les souris contre l'arthrite induite au collagène [163–165]. Deux études indépendantes ont également montré que l'électrotransfert dans le muscle de plasmide codant des récepteurs solubles du $\text{TNF}\alpha$, conduisait à une inhibition de cette cytokine pro-inflammatoire entraînant une diminution des signes cliniques et histologiques de la maladie [166, 167]. L'effet d'un seul traitement par électrotransfert était dans ce dernier cas comparable à l'effet obtenu par des injections répétées de protéine recombinante, l'Ethanercept [167]. Récemment, une équipe a montré que l'inhibition de l'action de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 par électrotransfert d'un plasmide codant un récepteur de l'IL-1 conduisait là encore à une amélioration des scores cliniques [168].

L'électrotransfert intramusculaire peut également être utilisé pour la production d'anticorps monoclonaux [169] : Perez et al. ont récemment démontré que l'injection et électrotransfert de gènes codant des immunoglobulines permettait une production d'anticorps monoclonaux par le muscle, pouvant atteindre une concentration plasmatique entre 800 et 1500ng/ml en trois semaines [147].

Ces différentes études montrent que l'électrotransfert intramusculaire peut être utilisé pour atteindre en systémique des niveaux thérapeutiques de protéine sécrétée.

3.2 Maladies musculaires

L'électrotransfert dans le muscle est une technique applicable sur des muscles fragiles tels que les muscles de souris dystrophiques. L'expression de la chaîne 2 de la laminine a par exemple été obtenue chez des souris dystrophiques sans dommage musculaire trop important [170] bien qu'une perte d'expression soit observée au cours du temps, causée par un phénomène de dégénération/régénération du muscle. Cette technique s'est avérée efficace également pour l'expression de la dystrophine entière de souris sur un modèle de souris dystrophiques [171, 172].

3.3 Production d'anticorps par immunisation génétique

La possibilité d'obtenir une immunisation par injection d'un ADN a été démontrée pour la première fois il y a une dizaine d'années [173, 174]. Elle consiste à injecter directement dans le muscle squelettique ou la peau les gènes codant les protéines antigéniques. L'organisme produit lui-même les antigènes qui vont induire la réaction immunitaire. Il est maintenant bien établi que l'immunisation par ADN induit une réponse durable à la fois cellulaire et humorale [175, 176], bien que le mécanisme conduisant à cette réponse ne soit pas entièrement élucidé (voir chapitre 3 pour plus de détails). Ce type d'immunisation est souvent développé dans un but vaccinal anti-viral ou anti-bactérien, mais il apparaît clairement que l'on peut l'utiliser pour provoquer chez l'animal la production d'anticorps contre l'antigène injecté avec des titres élevés.

De nombreuses publications récentes font état de cette réponse humorale, dont on peut citer quelques exemples : une injection intramusculaire unique de plasmide codant une protéine de l'enveloppe du virus HBV (hépatite B) provoque la production d'anticorps pendant au moins 74 semaines [177], à un titre compatible avec une protection efficace. Des anticorps neutralisants contre le virus de la rage ont été obtenus chez le chien après administration d'un plasmide codant une glycoprotéine du virus. Ces anticorps sont produits pendant au moins cinq mois. Des souris traitées par un sérum de chien immunisé montrent un taux de survie de 100% lorsqu'elles sont infectées par le virus de la rage [178]. Lorsqu'un plasmide codant un génome muté du virus de Kunjin est injecté intramusculairement chez la souris, des anticorps neutralisants sont produits avec un titre variant de 10 à 40. Si ces souris sont soumises au virus sauvage de Kunjin, ou au très ressemblant virus West Nile, elles sont protégées (0 à 20% de mortalité) [179]. L'injection intramusculaire chez la souris de plasmide codant la partie membranaire de la protéine humaine PSMA (prostate specific membrane antigen) conduit à la production d'anticorps contre cette protéine [180].

Pathogène	Antigène	ET	Ref.
<i>Virus</i>			
Hépatite B	antigène de surface HbsAg		[177]
	HbsAg	+	[96]
Hépatite C	glycoprotéine de l'enveloppe	+	[181]
HSV-1	glycoprotéine B, glycoprotéine D		[182]
	glycoprotéine D		[183]
HIV-1	nef, rev, tat, glycoprotéine 160, p24		[184]
	gag		[185]
Grippe	hémagglutinine (HA)		[186]
	hémagglutinine (HA)	+	[187]
Rage	protéine G		[178]
<i>Bactérie</i>			
<i>Clostridium tetani</i>	fragment C-terminal		[188]
<i>Mycoplasma tuberculosis</i>	heat shock protein (hsp65)		[189]
	MPB70, Ag85B, Hsp65	+	[100, 190]
<i>Parasite</i>			
<i>Plasmodium falciparum</i>	protéine circumsporozoite (CSP)		[191]

TAB. 5 – *Exemples d'études utilisant l'immunisation génétique.* Le signe «+» signifie qu'il y a eu un électrotransfert (ET).

Ces quelques exemples montrent qu'il est possible d'obtenir des anticorps neutralisants avec des titres satisfaisants chez l'animal par immunisation par l'ADN. Ceci est surtout vrai chez la souris, mais la méthode est un peu moins efficace chez les animaux plus gros. Ceci est peut-être attribuable à une moindre efficacité du transfert de gène [192, 193].

Une bien meilleure efficacité de transfert de gène peut être obtenue en utilisant la technique physique d'électrotransfert. Ceci permet d'améliorer l'expression des protéines de plusieurs ordres de grandeur, ce qui est un avantage puisqu'il a été montré que le titre en anticorps produit dépend du taux d'expression du transgène [194, 195].

Plusieurs études récentes montrent l'intérêt de la technique d'électrotransfert lors de l'immunisation par ADN : par exemple, le titre en anticorps produit augmente d'un facteur 100 chez la souris après électrotransfert d'un plasmide codant un antigène de surface du virus HBV [96]. Ce facteur d'augmentation est de l'ordre de 10 dans le cas de lapins ou de cochons d'Inde. Des titres élevés en anticorps ont également été obtenus chez la souris et le lapin après électrotransfert intramusculaire d'un plasmide codant une glycoprotéine de l'enveloppe du virus de l'hépatite C [181], et chez la souris après électrotransfert d'un plasmide codant une protéine du bacille de la tuberculose [190]. Il a été montré au laboratoire que l'électrotransfert d'un plasmide codant l'hémagglutinine de la grippe induisait une meilleure réponse immune chez la souris qu'une simple injection intramusculaire [187]. Enfin, on peut noter qu'il a été possible de générer des anticorps monoclonaux contre des allergènes de mites après immunisation de souris par électrotransfert [196]. Cette technique est également applicable à des animaux plus gros tels que la chèvre ou les bovins, après anesthésie locale [100].

L'immunisation génétique est un concept totalement novateur en vaccination. Cette méthode simple et peu coûteuse, présente plusieurs avantages : l'antigène est produit généralement sous sa forme native, il est produit de façon prolongée par les cellules de l'organisme, ce qui peut permettre d'éviter le recours aux rappels pour certains vaccins et cette stratégie ne présente aucun risque d'infection post-vaccinale. Il faut cependant noter que, à l'heure actuelle, ce type de vaccination n'est pas encore aussi efficace que la vaccination classique. Le risque d'intégration de l'ADN introduit dans les cellules de l'organisme, doit également être évalué avant une utilisation à grande échelle de ce type de vaccination.

3.4 Cancers

Le cancer représente le principal domaine d'essais d'application de la thérapie génique (voir tableau 1). L'électrotransfert est donc également utilisé dans des stratégies anticancéreuses. Différentes stratégies peuvent être envisagées, on peut globalement les regrouper en quatre concepts principaux : (a) stimulation de la réponse immunitaire contre une tumeur (cette stratégie rejoint l'application précédente) [197–201], (b) utilisation de gènes suicides [5, 202, 203], (c) réparation des défauts du cycle cellulaire causés par la perte de gènes suppresseurs de tumeurs ou l'activation inappropriée d'oncogènes [204–206], (d) inhibition de l'angiogénèse tumorale [207]. Nous ne développerons pas plus cette application qui ne fait pas l'objet de ce travail (pour une revue détaillée, voir [208]).

3.5 Electrotransfert comme un outil

Nous décrirons dans ce paragraphe quelques exemples d'application de l'électrotransfert comme outil de transfert de gène pour l'étude de fonction de gènes ou la mise au point de systèmes de régulation.

Etude d'expression et fonction de gènes

L'électrotransfert est un outil efficace pour l'étude de l'expression et des fonctions d'un gène dans une grande diversité de tissus.

Cette technique est en particulier utilisée en biologie du développement [125]. Saito et al. ont par exemple réalisé un électrotransfert dans le cerveau d'embryons de souris *in utero* et *ex utero* [126] : ils ont observé l'expression de la GFP dans différentes régions ciblées du cerveau et ont visualisé la morphologie de neurones. Dans une autre étude, l'électrotransfert a été utilisé pour l'inactivation d'un gène d'une voie de signalisation dans une étude de régénération de nageoire [209].

ARN interférence

Très récemment il a été démontré qu'un ARN double brin pouvait être introduit efficacement par électrotransfert *in vivo* dans différents tissus, tels que l'embryon de poulet [210, 211], le cerveau de rat [212], le muscle de souris [213, 214] ou la rétine [135], conduisant au mécanisme d'ARN interférence.

Ces deux approches, transfert d'un ADN ou d'un ARN double brin par électrotransfert *in vivo*, sont deux méthodes complémentaires et utiles pour l'analyse de fonction de gènes. En effet deux stratégies sont couramment utilisées pour étudier la fonction d'un gène *in vivo* : l'analyse du gain ou de la perte de fonction. L'électrotransfert *in vivo* est un outil pour ces deux stratégies : le gain de fonction peut être obtenu en surexprimant un gène d'intérêt, alors que la perte de fonction peut être obtenue par stratégie antisens ou ARN interférence. Dans ce contexte, on peut citer par exemple, le développement de l'électrotransfert *in ovo* chez le poulet qui permet d'introduire simplement et efficacement divers acides nucléiques dans l'embryon de poulet, qui est un modèle classique pour des études de développement [215].

Etude de systèmes de régulations

L'électrotransfert peut être un outil efficace pour l'étude et la mise au point de systèmes de régulation, comme le système à la tétracycline qui nécessite la co-transfection d'au moins deux plasmides au sein d'une même cellule. Par exemple, Lamartina et al. ont étudié par électrotransfert l'activité de nouveaux transactivateurs sensibles à la doxycycline dans un système de régulation [216]. Nous avons également étudié par électrotransfert l'efficacité d'un système de régulation de l'expression de gène composé de trois plasmides utilisant le système répressible à la tétracycline combiné à une stratégie antisens ([217] et chapitre 2).

4 Régulation temporelle de l'expression des gènes

4.1 Une large étendue d'applications

Dans le contexte du transfert de gène *in vivo*, il est très utile voire même indispensable de disposer d'un système de régulation de l'expression de gène, que ce soit pour appréhender leur fonction ou pour moduler leur activité à des fins thérapeutiques.

A l'heure actuelle, la connaissance de l'ensemble du génome humain a comme conséquence le clonage et la caractérisation fonctionnelle de nombreuses nouvelles protéines, qui exigeront des études fonctionnelles à la fois *in vitro* et *in vivo*. Étudier la fonction d'un gène nécessite souvent l'expression du gène à un moment bien particulier (développement), d'où l'intérêt de disposer

d'un système de régulation efficace. En effet, éteindre totalement ces gènes (animaux K-O) ou les surexprimer (animaux transgéniques) peut parfois conduire à une létalité embryonnaire [218,219].

Pour un développement clinique sûr et efficace de traitements par thérapie génique, il est indispensable de développer des systèmes de régulation capables de moduler finement l'expression de gènes afin d'éviter les effets indésirables d'un surdosage. En effet, pour assurer une efficacité biologique optimale, la quantité de protéines exprimées dans les cellules cibles ou dans la circulation sanguine doit se situer dans la fenêtre thérapeutique de la maladie à traiter.

De plus une expression continue du gène thérapeutique ne peut être autorisée pour un traitement thérapeutique : il est essentiel de contrôler le moment où le «gène médicament» est exprimé et l'arrêt du traitement si nécessaire.

4.2 Stratégies de régulation de l'expression d'un gène

De l'ADN à la protéine : de nombreux points de régulation possibles

Chez les eucaryotes, la plupart des gènes sont localisés dans le noyau des cellules. Leur expression ayant lieu dans le cytoplasme, il faut un intermédiaire qui permette la transmission fidèle de l'information d'un compartiment à l'autre : c'est l'ARN messager (ARNm) qui joue ce rôle pivot dans la cellule. Ce dernier constitue une cible intéressante pour le développement de stratégies de régulation de l'expression d'un gène. Deux approches ont été envisagées : agir soit en amont de la synthèse de l'ARNm en modulant l'activité du promoteur qui en contrôle la transcription, soit au niveau ou surtout en aval de la transcription, en neutralisant la molécule d'ARN messager.

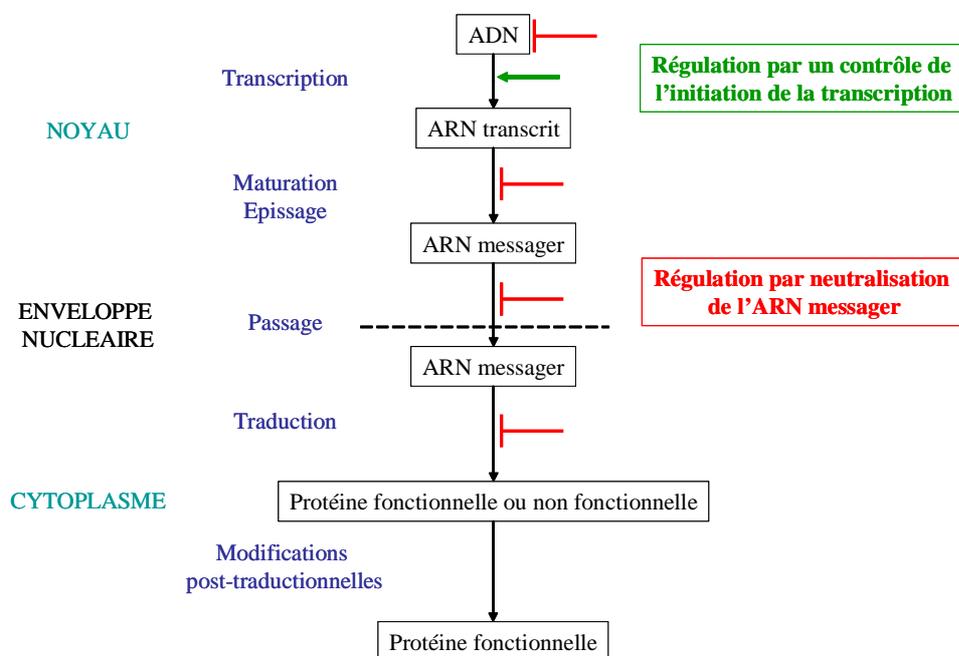


FIG. 11 – Schéma général de la synthèse d'une protéine avec les différentes étapes de transcription et de traduction ainsi que les deux stratégies de régulation possibles.

4.3 Régulation par neutralisation du gène ou de son ARN messenger

Fondées sur le rôle pivot de la molécule d'ARN messenger dans les processus cellulaires qui conduisent à l'expression des protéines, des stratégies de contrôle négatif de l'expression d'un gène ont été développées pour inactiver la molécule d'ARN messenger elle-même. Ces stratégies de régulation peuvent être appliquées sur des gènes endogènes ou des gènes hétérologues portés par des vecteurs. Ces nouvelles approches sont intéressantes pour étudier les effets pharmacologiques de l'inhibition de l'expression d'un gène et particulièrement prometteuses comme agents thérapeutiques pour le traitement d'infections virales, de cancers, ou de maladies inflammatoires.

Il existe de nombreuses stratégies pour éteindre le produit d'un gène : des stratégies anti-gène et des stratégies anti-ARN messenger (pour une revue, voir Jen et al. [220] et Achenbach et al. [221]). La méthode de choix dépendra de plusieurs paramètres parmi lesquels : la durée souhaitée de l'action inhibitrice, la stabilité et la localisation de la protéine, l'accessibilité de la cellule cible.

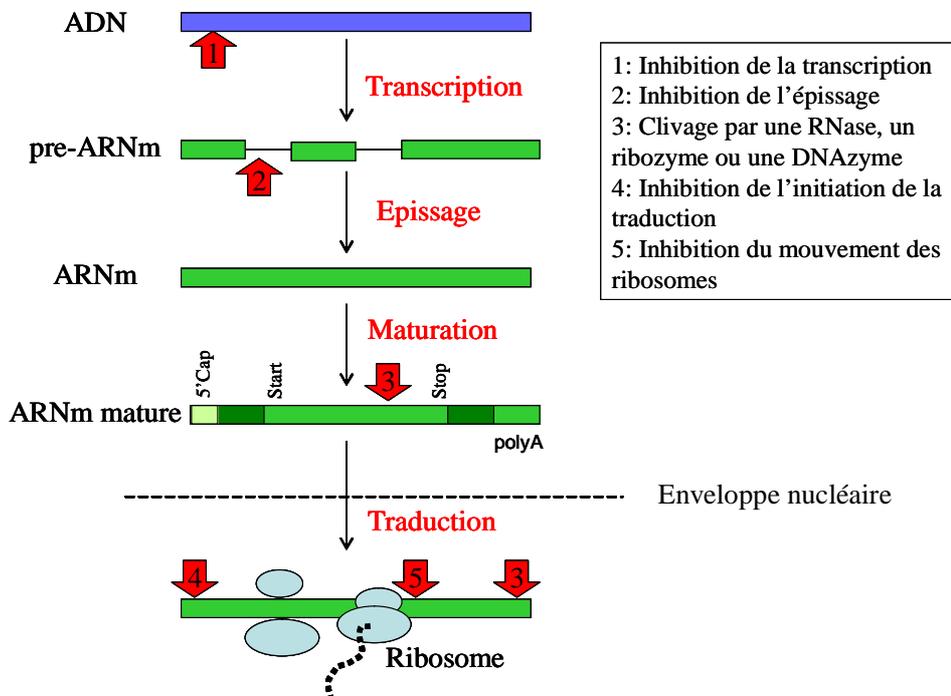


FIG. 12 – Schéma général des différentes stratégies de régulation par neutralisation de l'ARN messenger. d'après [222]

Stratégie anti-gène : ciblage direct du gène d'intérêt

Les stratégies «anti-gène» ne sont pas à proprement parler des stratégies de neutralisation de l'ARN messenger puisqu'elles agissent en amont de la synthèse de cet ARN messenger, au niveau de la transcription. Mais le résultat est le même : elles conduisent à l'absence d'ARN messenger d'intérêt.

Knock-out par recombinaison homologue : interruption physique du gène cible par recombinaison homologue entre le chromosome contenant le gène cible et un vecteur contenant une

version mutée du gène cible [223]. La recombinaison homologue s'effectue lors de la division cellulaire. Cette technique reste cependant peu efficace (rendement de recombinaison faible) et très coûteuse. Elle reste uniquement applicable pour des lignées cellulaires ou des modèles animaux, mais en aucun cas pour des applications cliniques car elle nécessite une sélection des cellules dans lesquelles l'évènement de recombinaison a eu lieu.

TFO (Triplex Forming Oligonucleotide) : utilisation d'oligonucléotides synthétiques capables de s'hybrider avec de l'ADN double brin. La formation d'une triple hélice entre l'oligonucléotide et le double brin d'ADN empêche la transcription. La formation de la triple hélice nécessite la formation de deux liaisons hydrogènes entre chaque base du TFO et la séquence complémentaire dans le duplexe d'ADN. Ceci contraint les TFO à pouvoir s'hybrider uniquement sur les bases purines de groupement polypurine-polypyrimidiques de l'ADN. L'efficacité de ces TFO est cependant limitée par l'accessibilité de l'ADN compacté dans la structure chromosomique et la faible stabilité de la triple hélice.

Leurre (decoy) : utilisation d'ADN double brin synthétique comme leurre pour les facteurs de transcription. En effet ces derniers reconnaissent et se lient sur des séquences spécifiques d'ADN. Il est donc possible d'introduire des séquences d'ADN synthétiques qui vont entrer en compétition avec les séquences d'ADN natives pour les facteurs de transcription [224].

Stratégie anti-ARNm

L'idée est dans ce cas de cibler l'ARNm d'un gène d'intérêt, prévenant ainsi la synthèse de la protéine correspondante. D'un point de vue stoechiométrique, cette stratégie peut paraître moins favorable qu'une stratégie anti-gène, mais elle est cependant attractive car l'ARNm est en définitive plus accessible, car il est en simple brin.

Leurre : utilisation d'oligonucléotides qui jouent le rôle d'un site de fixation alternatif ou leurre pour des éléments stabilisateurs qui interagissent normalement avec un ARNm donné. En éloignant ces protéines stabilisatrices de l'ARNm, le decoy ou leurre, induit une déstabilisation et donc une destruction de l'ARNm.

Approches antisens : utilisation de séquences d'acides nucléiques antisens (complémentaires) entraînant la formation intracellulaire d'un hybride entre l'ARN messenger cible et la séquence en antisens par un appariement des bases complémentaires. Le duplexe ainsi formé empêche la traduction de l'ARNm initial et initie des mécanismes conduisant à sa destruction. Les différents types de séquences antisens, qui varient selon leur nature chimique, peuvent agir à différentes étapes de la synthèse d'une protéine mais ils ont tous comme fonction ultime d'inhiber la synthèse de cette protéine [225].

L'acide nucléique antisens peut prendre différentes formes :

(1) ARNm antisens codé par un vecteur : on introduit dans la cellule cible un vecteur codant le gène d'intérêt en orientation antisens. Il y aura donc transcription d'un ARNm complémentaire de l'ARNm cible. La formation intracellulaire d'un hybride entre l'ARNm naturel et la séquence antisens inhibe la synthèse de la protéine par deux mécanismes possibles : (i) en

bloquant physiquement l'accès à la machinerie transcriptionnelle ou (ii) en marquant l'ARN pour un dégradation par la RNase III (la RNase III hydrolyse les ARN double-brins).

Les principaux avantages de ces longs ARNm antisens sont leur grande spécificité d'hybridation et le fait qu'ils soient synthétisés en permanence par la cellule [226].

(2) Oligodéoxynucléotides antisens (ODN) : on introduit dans la cellule cible un court oligonucléotide synthétique (entre 15 et 25nt en général) d'ADN complémentaire de sites spécifiques sur la séquence de l'ARNm cible, formant ainsi un hybride ARN :ADN. Il s'ensuit différents mécanismes possibles conduisant à l'extinction du gène ciblé : interruption de l'épissage, du transport, de la traduction ou de la stabilité du transcrit. Sur la base du mécanisme d'action, on peut discerner deux classes d'ODN antisens : (a) les oligonucléotides antisens dépendant de la RNase H, qui induisent la dégradation de l'ARN messager ; et (b) les oligonucléotides bloqueurs stériques, qui inhibent ou bloquent physiquement la progression de l'épissage ou la machinerie traductionnelle.

La majorité des ODN antisens utilisés fonctionnent via un mécanisme dépendant de la RNase H. La RNase H est une enzyme ubiquitaire qui hydrolyse le brin d'ARN d'un hybride ARN :ADN. Ces ODN antisens peuvent être très efficaces, l'inhibition de l'expression d'un gène pouvant atteindre 80-95%. De plus, contrairement aux ODN antisens bloqueurs stériques, les ODN antisens dépendants de la RNaseH peuvent inhiber l'expression d'une protéine quelle que soit la région de l'ARNm ciblée, alors que les ODN antisens bloqueurs stériques sont efficaces uniquement s'ils ciblent des régions 5' ou la région du codon initiateur AUG [227]. Depuis les années 90, le squelette des ODN antisens a été modifié chimiquement pour augmenter leur solubilité, leur stabilité, leur efficacité, leur résistance aux nucléases, et leur pénétration dans les cellules (pour une revue voir [228]).

- Les **phosphorothioates** sont les plus utilisés car ils sont relativement stables dans la circulation sanguine et capables d'atteindre quasiment tous les types cellulaires lors d'une injection intraveineuse, de plus ils restent des substrats de la RNase H. Cependant ils ont une haute affinité pour de nombreuses protéines cellulaires conduisant à des effets non spécifiques de la séquence. De plus, à forte dose, ils inhibent les polymérases et la RNaseH pouvant ainsi les rendre inefficaces comme agents antisens. Ils sont par ailleurs toxiques.
- Les modifications en 2' : **O-methyl, fluoro, O-propyl, O-allyl** entraînent une augmentation de la stabilité des duplexes avec l'ARNm avec des effets antisens indépendants de la RNase H. Les premiers ODN modifiés furent des méthylphosphonates, qui se révélèrent cependant inefficaces lors d'essais *in vivo*.
- Les modifications du squelette : Une nouvelle génération a vu le jour avec les **PNA** (Peptide Nucleic Acids) dont le squelette est constitué d'acides aminés et sur lequel sont greffées les bases [229]. Ils sont donc chimiquement plus apparentés avec les protéines que les acides nucléiques, mais peuvent former avec les acides nucléiques (ADN ou ARN) des hybrides plus stables que les hybrides nucléiques. L'introduction dans les cellules de PNAs complémentaires à une séquence cible peut ainsi conduire à l'extinction d'un gène.

Les ODN phosphorothioates et méthoxyéthyl sont déjà utilisés dans des essais cliniques (pour une revue voir [230]), on peut citer par exemple l'ODN genasense (Genta, USA) qui cible Bcl2 pour les mélanomes métastatiques, ou même commercialisés comme le Vitravene (Isis Pharmaceuticals, USA) qui est un ODN phosphorothioate antisens utilisé pour traiter la rétinite à CMV (cytomégalovirus) chez certaines personnes vivant avec le VIH.

(3) ARNi (ou ARN interférence) : utilisation d'ARN double brin qui induira une extinction de l'ARNm correspondant. L'ARNi est à la base un mécanisme de défense naturel de la cellule face à une invasion par des agents étrangers tels que des rétrovirus. C'est un processus post-transcriptionnel qui est déclenché par l'introduction d'ARN double-brin (ARNdb) dans la cellule et qui mène à l'inactivation d'un gène d'une manière séquence-spécifique. Ce phénomène naturel connu depuis plusieurs années a été initialement découvert dans les plantes (post-transcriptional gene silencing, PTGS). Le principe de l'ARN interférence repose sur l'introduction d'une courte séquence d'ARN double brin (21 pb), le siRNA (small interfering RNA), dans les cellules provoquant une inhibition sélective et efficace de la traduction de l'ARN messager complémentaire d'un des deux brins. Ces siRNA servent de signaux pour activer le complexe enzymatique RISC (RNA-Induced Silencing Complex, localisation cytoplasmique) qui contient les protéines nécessaires au clivage de l'ARNm cible. Les siRNA sont incorporés dans le complexe RISC où ils sont déroulés grâce à l'activité hélicase du complexe. Une fois déroulés, le simple brin guide le complexe RISC vers l'ARNm cible de séquence complémentaire et il en résulte un clivage endonucléolytique de l'ARNm (la nucléase intervenant dans cette deuxième étape est encore inconnue) conduisant à une inhibition de l'expression des protéines correspondantes [221].

(4) Ribozyme : ce sont des ARN catalytiques capables de cliver et/ou de former des liaisons covalentes de très haute spécificité avec l'ARN naturel cible complémentaire auquel ils sont appariés, sans l'aide d'enzyme. En effet, ils sont dotés d'une activité hydrolase, portée par une courte séquence consensus dérivée des ribozymes «têtes de marteaux» («hammerhead») et «épingle à cheveux» («hairpin»). Ils ont l'avantage d'inactiver définitivement la cible. Cet outil a été largement utilisé pour inhiber de façon spécifique l'expression d'un gène cible en clivant son ARNm cible, plus spécialement pour le traitement de maladies d'origine virale, génétique ou cancéreuse. De la même façon que les ODN, les ribozymes se lient à l'ARN cible par des liaisons de type Watson-Crick ce qui entraîne un clivage spécifique de la séquence. Ces agents devraient avoir une meilleure efficacité que les ODN dépendants de la RNase H car ils font intervenir une cinétique avec deux biomolécules uniquement au lieu de trois pour les ODN (l'ODN, l'ARNm et la RNase H). De plus ces ribozymes peuvent être modifiés chimiquement comme les ODN ou peuvent être exprimés à partir d'un vecteur ce qui permet d'avoir une production en continu de ces molécules dans la cellule. Cependant pour fonctionner ces ribozymes doivent non seulement se lier à l'ARNm cible pour le cliver mais ensuite se détacher de l'ARNm pour agir sur d'autres ARNm. Cette étape de dissociation est souvent l'étape limitante.

(5) DNAzyme : ce sont des séquences d'ADN ayant une activité catalytique. L'attrait des DNAzymes par rapport aux ribozymes est leur facilité de production et leur plus grande stabilité du fait que ce soit de l'ADN et non de l'ARN. De la même façon, ces DNAzymes peuvent être modifiés chimiquement.

(6) Aptamères : Contrairement aux stratégies précédentes qui faisaient appel à des inhibiteurs de séquences complémentaires des ARN cibles, les aptamères sont engendrés à partir d'une banque aléatoire d'oligonucléotides. Ces derniers sont sélectionnés pour leur capacité à se fixer avec une forte affinité sur la structure du substrat cible intracellulaire qui peut être de nature très variée telle que des ARN mais aussi des ADN, des protéines ou des acides aminés. Des cycles d'amplification/sélection (méthode SELEX : systematic evolution of ligands by exponential enrichment) permettent l'identification de motifs montrant une bonne affinité pour la cible, et qui présentent ainsi un intérêt thérapeutique [231].

Approche	Description	Avantages	Inconvénients
ODN	ADNsb	facilité de production ciblage des introns modifications chimiques possibles (\uparrow sélectivité, \uparrow efficacité) bonne pénétration cellulaire	molécules synthétiques donc délivrance exogène activité aptamère réponse interférons effet non spécifique possible
ARN antisens	ARN	longue durée d'action possibilité de promoteurs tissus-spécifiques (ciblage tissulaire) possibilité de promoteurs inductibles	Nécessité de parvenir au noyau pour être transcrit
Ribozymes	ARN	haute spécificité (discrimine à une base près) domaine catalytique simple ciblage des introns ou de compartiments subcellulaires	limitation du choix de la cible (triplets GUC) activité aptamère
DNAzyme	ADNdb	facilité de production modifications chimiques possibles	délivrance exogène effet non spécifique possible ?
RNAi	ARNdb	efficace à faible concentration facilité de délivrance expression tissu-spécifique possible stabilité sans modification chimique car ARNdb	actif uniquement dans le cytoplasme (pas de ciblage d'introns, ni d'ARN nucléaires) effet non spécifique possible pas d'optimisation possible
aptamères	ADN ou ARN	diversité des structures générées sélection rapide par SELEX	nécessité du maintien de la conformation <i>in vivo</i> délivrance exogène

TAB. 6 – *Avantages et inconvénients des différentes approches antisens.*

Remarques

De nombreuses considérations doivent être prises en compte pour utiliser efficacement ces stratégies antisens sur des cellules :

(a) Sélection du site cible sur l'ARNm : l'ARNm dans une cellule est rarement linéaire. Il forme des structures secondaires complexes et interagit avec de nombreuses protéines cytoplasmiques. Le résultat final est une molécule d'ARNm en grande partie cachée, et seules de petites

parties de la séquence totale de l'ARNm sont accessibles pour l'hybridation. Des techniques ont été mises en place pour détecter ces régions cibles : on peut citer en particulier l'utilisation de la RNaseH comme indicateur des sites accessibles (un mélange d'ODN spécifiques de différentes régions de l'ARNm est mis en incubation avec l'ARNm puis l'ensemble est traité à la RNase H. On détecte ensuite par RT-PCR les sites qui ont été rendu vulnérables à la RNase H par les ODN.)

(b) Problème du transfert : une des principales limitations de l'utilisation d'oligonucléotides est le problème de leur transfert aux cellules cibles. Non complexés, ces ODN sont peu internalisés dans les cellules et rapidement dégradés : on les utilise principalement combinés à un vecteur chimique (comme par exemple des lipides cationiques, des porphyrines cationiques, des peptides fusogènes, ou du PEI [220]) ou associés à une méthode physique telle que l'électroporation.

(c) Localisation : il faut une colocalisation de l'ARNm et de l'agent antisens dans le même compartiment intracellulaire. Le trafic intracellulaire joue un rôle très important. De nombreux facteurs interviennent dans cette localisation de l'agent antisens : la nature de l'agent antisens lui-même, le vecteur, le type cellulaire. L'ARNm peut se situer dans différents compartiments cellulaires : le cytoplasme, le noyau, les nucléoles. Il ne semble pas y avoir de site de localisation préférentiel, le choix de la stratégie détermine le site optimal pour un effet antisens. Une étude a montré qu'en utilisant un ribozyme attaché à des petits ARN nucléolaires (snoRNA) on atteignait une efficacité de dégradation de 100% d'un ARN cible lui aussi dirigé dans le nucléole par des snoRNA [232]. Le substrat est dans ce cas artificiel mais l'idée est intéressante.

4.4 Régulation par un contrôle de l'initiation de la transcription

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

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

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

Exigences d'un bon système

Pour être utilisable dans différents domaines d'application, et particulièrement pour une utilisation en thérapie génique, il est important de sélectionner un système de modulation de l'expression qui permette une induction rapide, précise et réversible des gènes d'intérêt. Ainsi, on peut définir le système de régulation idéal comme celui qui répond aux critères suivants [233,234] :

- **spécificité** : le système ne doit pas interférer avec les réseaux de régulation endogènes et ne doit pas être activable par un ligand endogène.
- **sélectivité** : l'induction doit se faire uniquement par un inducteur exogène non toxique

- **inductibilité** : le système doit avoir un niveau d'expression basal faible et une induction rapide et élevée.
- **biodisponibilité** : l'inducteur doit être une drogue biodisponible par voie orale et capable de pénétrer tous les types tissulaires.
- **réversibilité** : l'inducteur doit avoir une cinétique d'élimination rapide dans tous les tissus pour permettre des cycles répétés et rapides d'induction/répression.
- **immunogénicité** : l'activateur de transcription et l'inducteur doivent avoir un faible potentiel immunogène.
- **dose-dépendance** : la réponse du système doit être modulable par variation de la concentration de l'inducteur.
- **«ON» switch** : l'inducteur doit activer la transcription («ON» switch) plutôt que l'inhiber («OFF» switch). Les systèmes «OFF» posent en effet plusieurs problèmes : ils nécessitent pour éteindre le système une exposition prolongée à la drogue inductrice et les cinétiques d'inductions dépendent fortement des cinétiques d'élimination de la drogue.
- **flexibilité** : les composantes du système de régulation doivent pouvoir être facilement modulables (mutations ponctuelles par exemple) pour une optimisation éventuelle ou une adaptation du système à différentes configurations thérapeutiques ou tissus spécifiques.

Systèmes existants basés sur des éléments endogènes

Les premiers systèmes de régulation de l'expression génétique développés reposaient sur des éléments de réponse endogènes (promoteurs, séquences activatrices de transcription («enhancers»)) qui répondaient à des changements physiologiques ou environnementaux exogènes tels que la chaleur [235], l'hypoxie [236], des cytokines [237] ou des métaux lourds [238] par exemple.

Ces systèmes présentent cependant un risque d'interférence avec les réseaux endogènes de régulation des cellules cibles, répondant aux mêmes inducteurs. Ces phénomènes pleïotropiques peuvent conduire à des effets secondaires non contrôlés [233]. C'est pourquoi de nouvelles approches de régulation basées sur des séquences exogènes (non mammifères ou des versions mutées d'éléments endogènes) ont été développées.

Systèmes existants basés sur des éléments exogènes

Systèmes régulables par la tétracycline

Système suppressible par la tétracycline : Tet-Off Le système régulable à la tétracycline a été développé initialement par Gossen et Bujard en 1992 sous le nom de système Tet-Off. Ce système est basé sur les éléments de régulation de l'opéron du gène de résistance à la tétracycline du transposon Tn10 d'*Escherichia coli* [239]. Chez la bactérie, la résistance à la tétracycline est assurée par une protéine dont l'expression est induite par l'antibiotique. L'induction se fait au niveau transcriptionnel en déplaçant par changement conformationnel une protéine répresseur de la transcription (tetR), normalement fixée sur un opérateur tetO.

Pour créer le système initial Tet-Off suppressible par la tétracycline, une protéine de fusion artificielle tTA a été construite en fusionnant le domaine de transactivation de la protéine VP16 du virus de l'herpès simplex avec le domaine de liaison à tetO de la protéine tetR. Le résultat est donc une protéine de fusion activatrice de transcription et sensible à la tétracycline. Sept copies de la séquence de tetO ont été placées en amont du promoteur minimum du CMV. Ainsi, en absence de tétracycline, la protéine de fusion tTA se fixe sur tetO et active la transcription. Par contre en présence de tétracycline, la protéine tTA subit un changement de conformation ce

qui diminue son affinité pour tetO et inactive ainsi indirectement l'initiation de la transcription (figure 13).

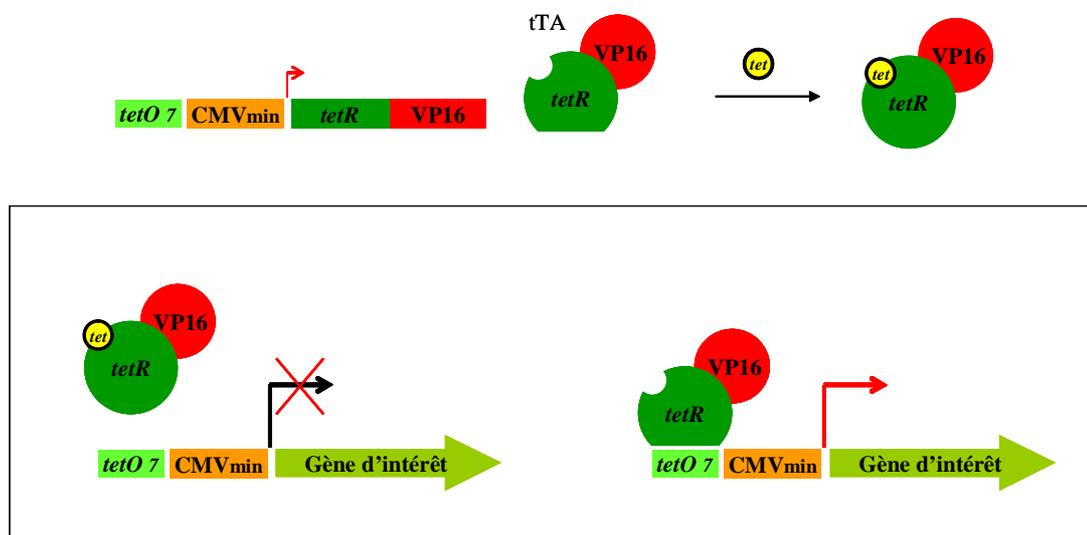


FIG. 13 – *Système suppressible par la tétracycline Tet-Off*

Une induction d'un facteur 10^5 a été reportée dans des cellules HeLa exprimant tTA constitutivement en passant de 1mM à une absence totale de tétracycline dans le milieu de culture [239]. Chez des souris transgéniques, des facteurs d'induction allant de 1 à 5000 ont été mesurés en fonction du tissu étudié [240]. Ce système de régulation a également été utilisé avec succès *in vivo* avec le gène de l'érythropoïétine [241] ou celui d'immunoglobulines permettant la production régulée d'anticorps monoclonaux [147].

Système inductible par la tétracycline : Tet-On Le principe du système Tet-Off implique d'administrer l'antibiotique inhibiteur pour annuler l'expression du gène d'intérêt. Ceci risque, dans certains cas, de nécessiter des traitements assez longs avec l'antibiotique. C'est pourquoi, à partir de ce système Tet-Off suppressible par la tétracycline, le groupe de Bujard a développé en 1995 un système inductible par la tétracycline appelé Tet-On [242]. Quatre acides aminés du tetR ont été modifiés pour créer le rtetR (reverse tetR). La protéine transactivatrice rtTA qui contient cette séquence n'a de forte affinité pour tetO qu'en présence de tétracycline ou de ses analogues (tels que la doxycycline) (figure 14).

Ce système a montré une bonne inductibilité en réponse à la tétracycline ou son analogue la doxycycline : un facteur de plus de 1000 fois a été observé dans des cellules HeLa exprimant le rtTA de manière constitutive en ajoutant de la doxycycline dans le milieu de culture. Chez des souris doublement transgéniques, une régulation positive induite par la doxycycline a été observée et les facteurs d'induction varient de 1 à 7000 selon les tissus [243]. Bien qu'efficace, les applications *in vivo* de ce système inductible ont été moins nombreuses que celles du système Tet-Off car de grandes quantités de doxycycline doivent être administrées et ce système de régulation Tet-On originel présente plus d'expression basale que le système Tet-Off, probablement due à une légère fixation résiduelle du rtTA au tetO en absence d'inducteur. Quelques-unes sont relatées dans la littérature [241, 244, 245].

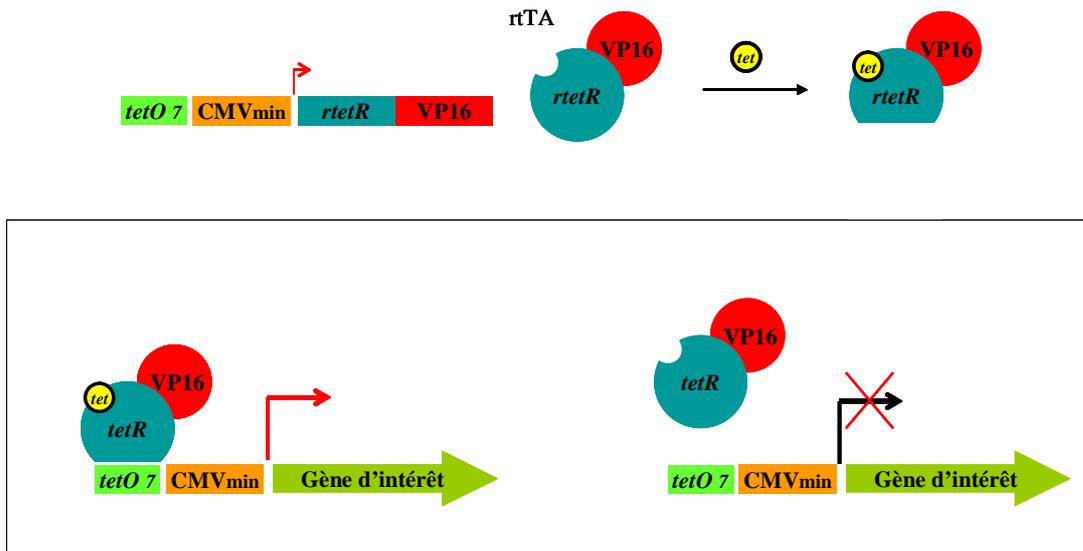
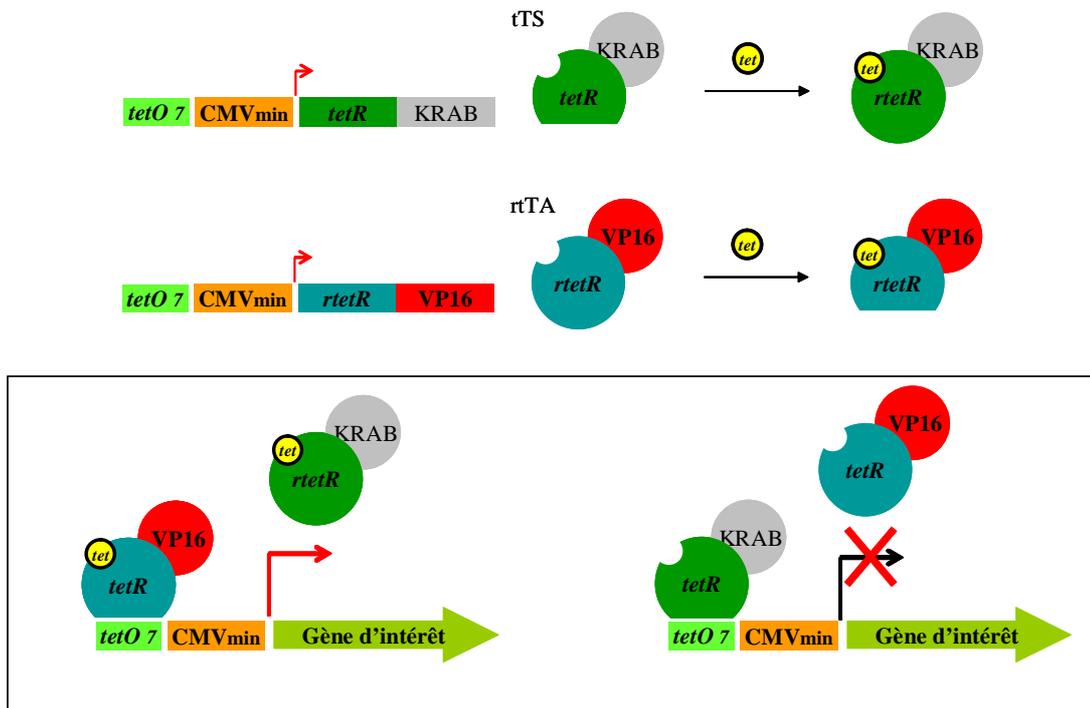


FIG. 14 – *Système inductible par la tétracycline Tet-On*

Dernières améliorations du système Tet-On De nombreuses modifications ont récemment été apportées au système Tet-On afin de réduire le niveau basal d'expression et d'augmenter l'efficacité du système en réponse à la doxycycline. Le progrès majeur a été l'isolation de deux nouveaux variants de rtTA, nommés rtTA2^S-S2 et rtTA2^S-M2 : ils sont toujours sensibles à la doxycycline mais ont un niveau d'activité basal beaucoup plus faible dans l'état non induit que le Tet-On original [246]. De plus, leur séquence a été optimisée par l'usage des codons, permettant une meilleure expression et une plus grande stabilité. Enfin ils possèdent un domaine de transactivation minimal noté VP16-F3 qui consiste en trois répétitions en tandem d'un peptide de 12 acides aminés dérivé de VP16 [246]. rtTA2^S-S2 présente un niveau basal légèrement plus faible que rtTA2^S-M2, ce dernier présentant néanmoins l'avantage d'être environ 10 fois plus sensible à la doxycycline [216, 246]. Plusieurs études ont prouvées que ces deux transactivateurs étaient capables de contrôler efficacement *in vivo* la transcription de nombreux transgènes après transfert dans différents tissus et ce avec une grande variété de vecteurs [216, 247, 248]. Néanmoins des études de dose/réponse semblent montrer que la robustesse du contrôle est perdue à fortes doses de vecteurs.

Un contrôle plus strict du bruit de fond résiduel du système Tet-On a également été obtenu en rajoutant un répresseur de transcription, ou «silencer» tTS (tétracycline transcriptional silencer) sous contrôle également de la tétracycline. Le tTS est le résultat de la fusion du domaine répresseur KRAB (Kruppel-associated Box) de la protéine humaine Kid-1 avec le répresseur de la transcription tetR initial [249]. La co-expression du rtTA et d'un tTS permet une régulation très sensible : en absence de doxycycline, le tTS se lie au tetO et inhibe la transcription basale ; en rajoutant la doxycycline, le tTS se dissocie de sa cible ADN pendant que le rtTA devient actif et active la transcription (figure 15).

Plusieurs études semblent montrer effectivement qu'un tel système dual rtTA/tTS réduit de façon significative le bruit de fond basal de l'expression d'un transgène *in vivo* [250–252]. Les versions les plus évoluées du système Tet-On combinent même les variants du rtTA, rtTA2^S-S2 et rtTA2^S-M2, avec le répresseur tTS [251–253].

FIG. 15 – *Système inductible par la tétracycline Tet-On + tTS*

Remarques Les systèmes Tet sont de loin les systèmes de régulation les plus utilisés actuellement. Une de leurs originalités repose sur l'origine procaryote des séquences *tetR*/*rtetR* et *tetO* qui assure une réponse spécifique et l'absence d'effets pléiotropiques. De plus, la doxycycline est un antibiotique non toxique pour les cellules de mammifères, dont la pharmacologie est bien connue et dont l'administration semble bien tolérée par les patients. La doxycycline est disponible par voie orale, a une demi-vie de 14-22 heures et a l'avantage de bien pénétrer dans les tissus. Les dernières versions du système Tet-On ont fonctionné chez les rongeurs et les singes avec des doses de doxycycline du même ordre de grandeur que celles couramment utilisées dans un but antibiotique [252]. La doxycycline est bien tolérée au moins à court et moyen terme (quelques mois) ; son seul inconvénient est que des traitements *in vivo* prolongés peuvent conduire à son accumulation dans les os ce qui a pour conséquence une libération lente de la drogue et donc une extinction du système Tet-On plus lente. Ceci représente une limitation pour des utilisations sur de longues périodes. Il faut également noter une possible résistance à cet antibiotique au cours du temps bien que cet antibiotique soit de moins en moins utilisé, et une possible immunogénicité du transactivateur de part son origine procaryote (voir chapitre 2).

Systèmes basés sur des récepteurs aux hormones stéroïdes

Système inductible par l'ecdysone : chez les insectes, l'ecdysone active une série d'événements transcriptionnels via un récepteur hétérodimérique formé du récepteur nucléaire EcR et du produit du gène ultraspirale (UPS). En présence de l'hormone, le récepteur EcR, complexé à USP se lie à des éléments de réponse et permet une transactivation de la transcription.

Ce système naturel de régulation a été modifié pour être utilisable chez les mammifères [254]. Un récepteur chimérique contenant le domaine de transactivation de VP16 fusionné à la partie

NH2 terminale du récepteur EcR muté (conservant sa sensibilité pour l'ecdysone et son site de liaison à l'ADN) a été construit. Le gène de l'USP a été remplacé par son homologue chez les mammifères : le récepteur alpha au rétinol X (RXR α) car il a été montré que les facteurs d'induction étaient supérieurs lorsqu'on exprimait EcR en sa présence [255]. Ainsi, en présence d'ecdysone ou de son analogue synthétique la muristérone A, le complexe hétérodimérique (VP16-EcR/RXR) se lie à des séquences spécifiques situées en amont du promoteur basal du gène d'intérêt et active la transcription.

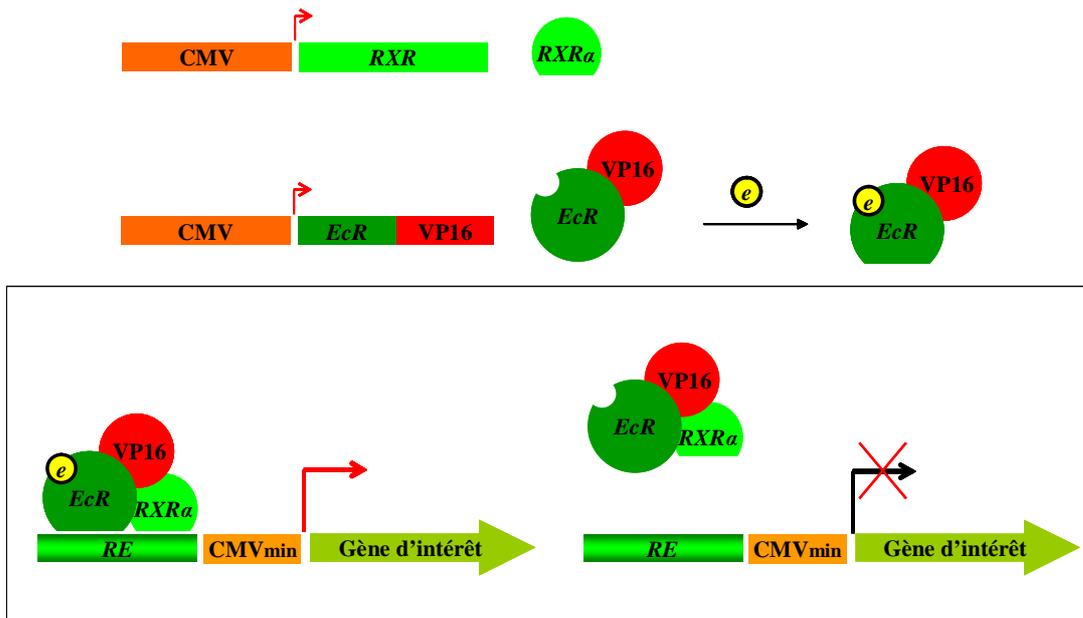
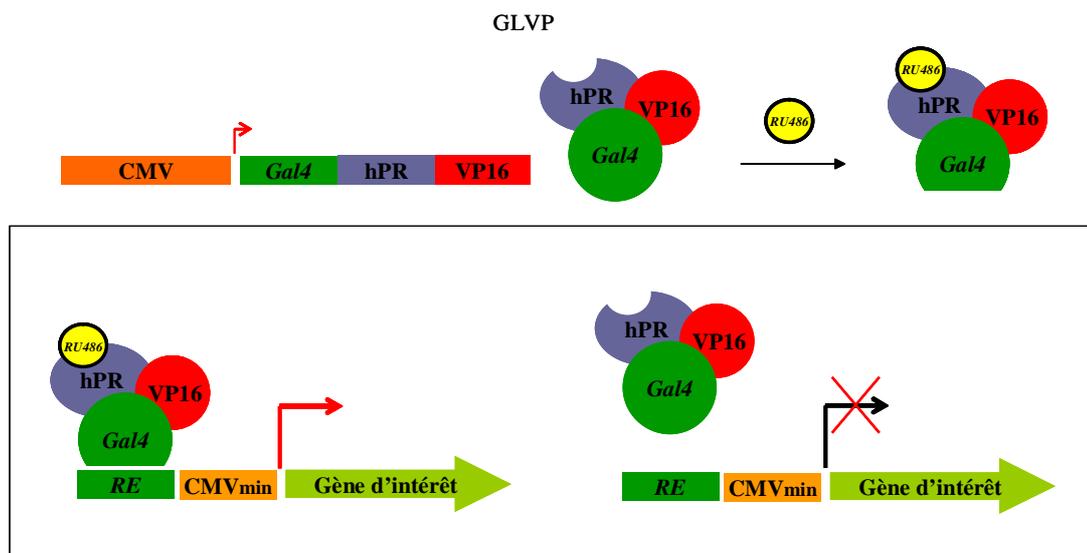


FIG. 16 – *Système inductible par l'ecdysone*

Ce système présente l'inconvénient de nécessiter l'expression simultanée de ses trois composants dans les cellules cibles. De plus, la surexpression du récepteur RXR risque d'entraîner des interactions avec d'autres voies de signalisation endogènes. Néanmoins, le système ecdysone donne des résultats très encourageants *in vitro* [256] et *in vivo* [254] et présente de nombreux avantages de par la nature de l'inducteur. En effet, la muristérone A est une molécule non toxique, dont la durée de vie est très courte, elle coûte cependant très cher. La diffusion dans les tissus est très efficace, de par son caractère lipophile.

Système inductible par la mifepristone/RU486 : ce système utilise une version mutée du récepteur à la progestérone humaine (hPR). Une délétion dans le domaine de liaison au ligand a été effectuée, supprimant la réponse à la progestérone mais conservant le site de liaison au RU486, qui agit alors comme un agoniste. Une protéine transactivatrice chimère GLVP a été construite en fusionnant le domaine de fixation du ligand de hPR avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal-4 et le domaine d'activation de VP16 [257, 258]. Le promoteur inductible est constitué de plusieurs sites de fixation de Gal-4 en amont du promoteur basal du gène d'intérêt.

Ce système, transfecté transitoirement dans des cellules permet une induction d'un facteur 50 en présence de 1 nM de RU486. Utilisé chez des souris transgéniques avec le gène de l'hormone de croissance humaine (hGH) sous son contrôle, ce système a permis d'observer des facteurs d'induction de 1500 à 3500 fois variant en fonction des doses de RU486 administrées [259]. Récemment, une protéine transactivatrice mutée a été construite pour augmenter la sensibilité du

FIG. 17 – *Système inductible par la mifepristone/RU486*

système [260]. Dans le but d'éliminer la protéine VP16 potentiellement immunogène, un autre laboratoire a substitué le domaine d'activation VP16 par la partie transactivatrice de p53 [261]. La très lente désinduction *in vivo* du système liée à la longue demi-vie de RU486 et à sa diffusion lente dans les tissus [244] constitue un obstacle à son développement. Un inconvénient supplémentaire de ce système est les propriétés abortives du composé RU486 ce qui rend impossible son utilisation clinique.

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

Dans le premier système décrit [262] la première protéine chimère est une fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de la protéine ZFHD-1 et trois domaines de liaison à la rapamycine de la protéine humaine FKBP12. La seconde protéine chimère du système contient le domaine de liaison à la rapamycine de la protéine cellulaire humaine FRAP (FKBP12-rapamycin-associated protein), associée au domaine de transactivation de la protéine NF κ B p65. L'interaction de la rapamycine ou de son analogue FK506 avec FKBP12 et FRAP entraîne la constitution d'un activateur de transcription qui active le promoteur inductible comportant des sites de fixation de ZFHD I.

Ce système, introduit dans des vecteurs AAV, a permis après injection dans des muscles squelettiques de souris une régulation dose-dépendante de la sécrétion d'érythropoïétine [263] ou d'hormone de croissance humaine pendant plusieurs mois [264]. Ce système est très efficace. Il présente l'avantage que les protéines chimères qui le composent sont d'origine humaine et donc susceptibles d'être bien tolérées chez l'homme. La seule limitation du système est liée aux propriétés immunosuppressives de la rapamycine ou de son analogue FK506 qui pourraient ainsi conduire à des effets pleiotropiques dans les cellules cibles. L'utilisation de dérivés non-immunosuppressifs s'impose pour une application thérapeutique. La synthèse de certains d'entre eux a déjà été pu-

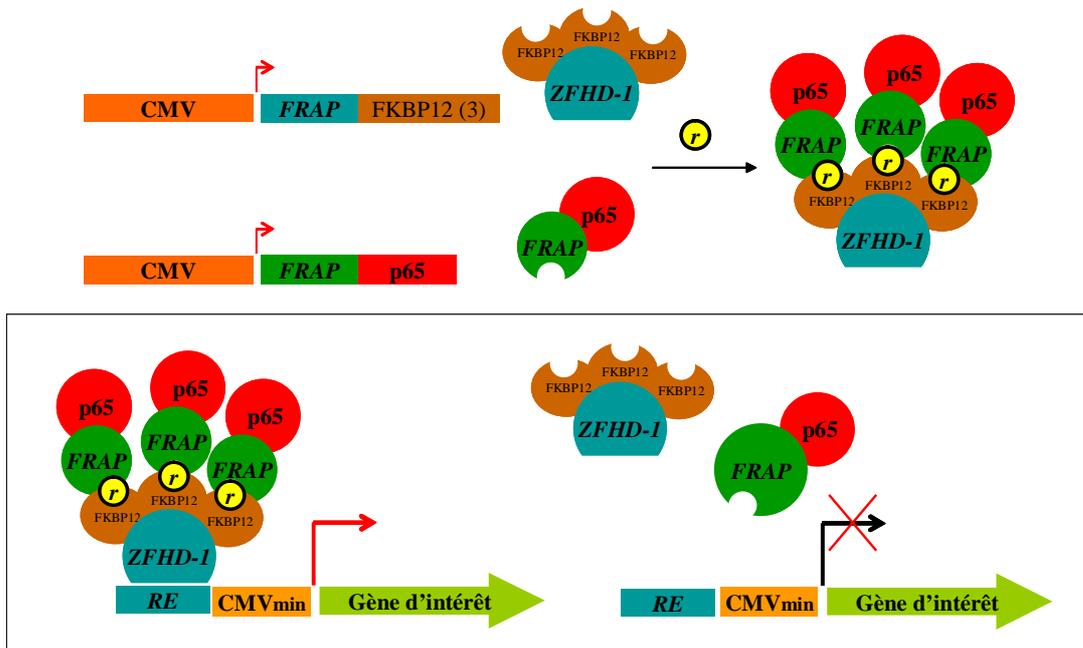


FIG. 18 – *Système inductible par la rapamycine*

blée [265]. Une autre contrainte du système est la nécessité d'exprimer simultanément dans les cellules les trois éléments qui le composent.

D'autres systèmes de régulation basés sur la formation d'un dimère ont été décrits (voir la revue de Pollock et al. [266]).

5 Description du projet de thèse

Une revue récente [267] sur les vecteurs de thérapie génique énumérait quatre points cruciaux sur lesquels des progrès doivent être faits : améliorer les techniques de transfert de gène pour les rendre plus efficaces, contrôler dans le temps et dans l'espace l'expression du gène d'intérêt, maîtriser la durée d'expression du gène d'intérêt et s'assurer de la biosécurité de ce transfert de gène.

L'objectif de mon travail de thèse a consisté à étudier, à une moindre échelle, plusieurs de ces points autour de la technique physique de transfert de gène utilisée au laboratoire, l'électrotransfert.

Ce travail s'articule plus précisément en quatre parties :

- l'étude par imagerie optique du transfert de gène par électrotransfert
- la mise au point et la validation par électrotransfert d'un système de régulation temporel de l'expression des gènes en utilisant le système répressible à la tétracycline Tet-Off combiné à une stratégie antisens.
- l'utilisation de l'électrotransfert comme technique d'immunisation génétique pour la production d'anticorps à haut titre neutralisant les toxines botuliques A, B et E.
- l'étude de l'état de méthylation de l'ADN plasmidique après injection et électrotransfert dans le muscle tibial cranial et sa possible intégration dans le génome de souris

Matériel et Méthodes

1 Vecteurs plasmidiques

Les plasmides ont été construits en appliquant les techniques de clonage classiques : PCR, digestions par enzyme de restriction, électrophorèse sur gel d'agarose, purification des fragments, ligation, transformation bactérienne, culture bactérienne et mini-préparation [268].

1.1 Plasmides courants

Le plasmide pXL3296 est un vecteur d'expression de type pCOR (plasmide pourvu d'une origine de répllication conditionnelle [269]) (figure 1). Le site de clonage est flanqué en 5' d'un promoteur CMV β (promoteur minimum + enhancer ; -522/+74) et en 3' du signal de polyadénylation tardif (polyA) du virus SV40. Brièvement le système hôte bactérien/vecteur pCOR développé par Aventis Pharma permet la production d'ADN plasmidique chez une souche recombinante de *E.coli* (XAC₋₁pir116) tout en répondant à des critères importants de biosécurité puisque le vecteur pCOR ne possède pas de gène de résistance à un antibiotique.

Le plasmide pCR2.1 est un vecteur de clonage commercial (Invitrogen) utilisé linéarisé dans le kit TA Cloning[®] Kit (Invitrogen). Ce vecteur porte plusieurs marqueurs de sélection : un gène de résistance à l'ampicilline et un gène de résistance à la kanamycine. De plus, le site de clonage se situe au niveau d'une portion du gène de la β -galactosidase d'*E.coli*, *LacZ'*. Le gène *LacZ'* code la partie NH₂ terminale du gène de la β -galactosidase, peptide complémentaire indispensable pour que l'activité de l'enzyme dans la bactérie hôte. En faisant croître des colonies en présence d'un substrat artificiel (X-Gal, composé incolore) on permet l'hydrolyse de ce substrat par l'enzyme qui libère le produit X (5Br,4Cl-indol, coloré en bleu). Dans le cas d'un clonage, l'insertion d'un fragment dans le site de clonage du pCR2.1 entraîne l'interruption de l'expression du peptide complémentaire de la β -galactosidase, *LacZ'* : la bactérie ne pourra plus digérer le X-Gal, ce qui l'empêchera de prendre la couleur bleue caractéristique. On peut ainsi sélectionner les colonies ayant intégré le vecteur recherché sur milieu X-Gal+antibiotique.

Le plasmide pSL301 est un vecteur de clonage commercial (Invitrogen) comportant 51 sites de clonage uniques et un marqueur de sélection (gène de résistance à l'ampicilline).

Le plasmide pcDNA3.1 est un vecteur d'expression eucaryote commercial (Invitrogen) contenant un promoteur CMV et deux marqueurs de sélection (gènes de résistance à l'ampicilline et à la néomycine)(figure 1).

Le plasmide **pVax2** est un vecteur d'expression eucaryote (figure 1). Il a été construit à partir du plasmide pVax1 commercial (Invitrogen) en remplaçant son promoteur CMV d'origine par le promoteur CMV du pCMV β (Clontech). Il contient un marqueur de sélection (gène de résistance à la kanamycine).

NB : Pour des raisons de clarté, nous noterons par la suite CMV β le promoteur CMV du plasmide pCMV β .

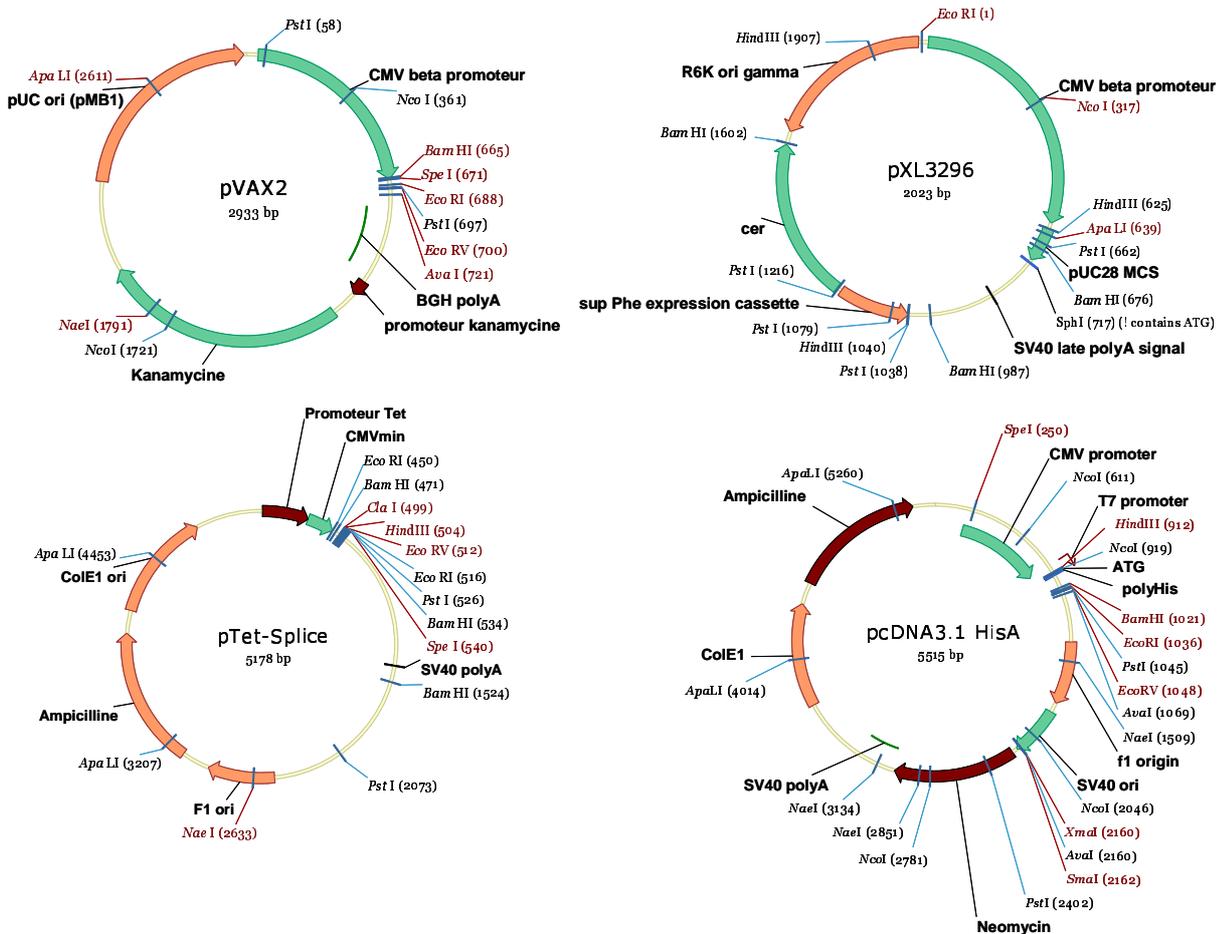


FIG. 1 – Description des principaux vecteurs d'expression utilisés.

1.2 Plasmides pour la construction du système de régulation

Le plasmide **pTet-Splice** est un vecteur d'expression eucaryote commercial (Gibco BRL) contenant un promoteur inducible par la tétracycline (TetP) constitué de sept copies de la séquence opérateur *tetO* placées en amont du promoteur minimum du CMV. Il contient un marqueur de sélection (gène de résistance à l'ampicilline) (figure 1).

Le plasmide **pTet-tTAK** est un vecteur commercial (Gibco BRL) codant un activateur de transcription eucaryote sensible à la tétracycline (tTA) sous contrôle du promoteur inducible par la tétracycline (TetP).

Le plasmide pTet-EpoAS a été construit en insérant le fragment *XbaI-HpaI* traité par Klenow du pXL3348 dans le site *EcoRV* du pTet-splice (Gibco-BRL). Le plasmide résultant contient le gène de l'érythropoïétine en orientation antisens sous contrôle du promoteur TetP.

Le plasmide pTet-Epo a été construit en insérant le fragment *XbaI-HpaI* traité par Klenow du pXL3348 dans le site *EcoRV* du pTet-splice (Gibco-BRL). Le plasmide résultant contient le gène de l'érythropoïétine de souris sous contrôle du promoteur TetP.

1.3 Plasmides utilisés pour l'imagerie

Le plasmide pEGFPC1 est un vecteur commercial (Clontech) contenant le gène d'un variant de la GFP (green fluorescent protein) sous contrôle du promoteur CMV β . Ce variant a été optimisé pour une fluorescence plus intense et une expression plus élevée (maximum d'excitation = 488 nm ; maximum d'émission = 507 nm).

Le plasmide pEGFPC1-luc a été construit en insérant le fragment *HindIII-XbaI* du pXL3031 après traitement par Klenow dans le pEGFPC1 digéré par *SmaI*. Ce plasmide contient le gène de la luciférase luc+ fusionné au gène de la GFP sous contrôle du promoteur CMV β .

Le plasmide pC1-luc a été construit à partir du pEGFPC1-luc en retirant l'ADNc de la GFP par digestion par *EcoRI-NheI* puis traitement par Klenow et ligature. Le plasmide obtenu contient le gène de la luciférase luc+ sous contrôle du promoteur CMV β .

Le plasmide pDsRed est un vecteur commercial (Clontech) contenant le gène DsRed-Express, un variant optimisé de la DsRed (red fluorescent protein) sous contrôle du promoteur CMV β (maximum d'excitation = 558 nm ; maximum d'émission = 583 nm).

Le plasmide pVaxLuc a été construit en insérant l'ADNc de la luciférase luc+ dans le site *EcoRV* du pVax2.

1.4 Plasmides pour l'obtention d'antisérum

Toxine A

Le plasmide pCR2.1-FcBoNTA nous a été fourni par le Dr. M. Popoff (Institut Pasteur). Le fragment C-terminal de la toxine botulique A noté FcBoNTA, amplifié par PCR avec les amorces 5'ccatggagaatattattaataacttctatattgaattt3' et 5'gtcgacttacagtggcctttctccca3' a été inséré dans le site de clonage du pCR2.1 en utilisant le kit TA cloning (Invitrogen).

Le plasmide pVaxFcBoNTA est un vecteur d'expression codant le fragment C-terminal de la toxine botulique A (FcBoNTA). Il a été construit en insérant le fragment *BamHI-EcoRV* du vecteur pCR2.1-FcToxA dans le vecteur d'expression pVax2 digéré avec les mêmes enzymes. Le gène FcBoNTA se trouvait alors en orientation antisens. Le plasmide résultant a donc été digéré par *BstXI*, enzyme possédant deux sites de restriction de part et d'autre du gène puis inséré à nouveau dans le même vecteur pour replacer ce fragment *BstXI-BstXI*, et donc le gène FcBoNTA, en orientation sens.

Les plasmides **040288pPCR-Script** et **040278pPCR-Script Variant** ont été synthétisés à notre demande par la société Geneart. Ils contiennent le fragment C-terminal de la toxine botulique A optimisé pour un usage des codons chez la souris (espèce *Mus musculus*), précédé d'une séquence Kozak gccacc, du signal de sécrétion de l'érythropoïétine de souris et de la phosphatase alcaline sécrétée humaine respectivement, et flanqués des sites de restrictions uniques *BamHI* en 5' et *XhoI* en 3'. Ces fragments ont été insérés dans le vecteur de clonage pPCR-Script (Stratagene).

Le plasmide **pVaxFc*BoNTA-Master** est un vecteur d'expression codant le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique A, précédé du signal de sécrétion de l'érythropoïétine de souris et d'un signal Kozak gccacc. Il a été construit en insérant le fragment *BamHI-XhoI* du vecteur 040288pPCR-Script (Geneart) dans le vecteur d'expression pVax2 digéré par les mêmes enzymes.

Le plasmide **pVaxFc*BoNTA-Variant** est un vecteur d'expression codant le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique A, précédé du signal de sécrétion de la phosphatase alcaline sécrétée humaine et d'un signal Kozak gccacc. Il a été construit de la même façon à partir du vecteur 040278pPCR-Script Variant dans le vecteur d'expression pVax2.

Le plasmide **pVaxFc*BoNTA** est un vecteur d'expression codant le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique A. Il a été construit à partir du plasmide pVaxFc*BoNTA-Master duquel on a retiré le signal de sécrétion par digestion par *BamHI-EcoRI* puis traitement par Klenow et ligature.

Le plasmide **pVaxKFc*BoNTA** est un vecteur d'expression codant le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique A précédé d'un signal Kozak. Ce fragment a été amplifié par PCR à partir du plasmide pVaxFc*BoNTA avec les amorces 5'cgggatcgcaccatggagaacatcatcaacacc3' et 5'gactcgagtattcacagtggcctctcgc3' puis digéré par *BamHI-XhoI* pour être inséré dans le pVax2 digéré avec les mêmes enzymes.

Toxine B

Le plasmide **pVaxFcBoNTB** contient le fragment FcBoNTB sous contrôle d'un promoteur CMV β . Ce fragment a été amplifié à partir du plasmide pCR2.1-FcToxB (fourni par le Dr. M. Popoff, Pasteur) avec les amorces 5'cgggatcgcaccatgttaaataatattatcttaaatttaagatataagg3' et 5'cgatatcttattcagtcacccttcatctttagg3' puis digéré par *BamHI-EcoRV*. L'insertion de ce fragment dans le vecteur pVax2 digéré avec les mêmes enzymes est actuellement en cours.

Le plasmide **042870pPCR-Script** a été synthétisé à notre demande par la société Geneart. Il contient le fragment C-terminal de la toxine botulique B optimisé pour un usage des codons chez la souris (espèce *Mus musculus*), précédé d'une séquence Kozak gccacc, du signal de sécrétion de l'érythropoïétine de souris, et flanqué des sites de restrictions uniques *SpeI* en 5' et *EcoRV* en 3'. Ce fragment a été inséré dans le vecteur de clonage pPCR-Script (Stratagene).

Le plasmide **pVaxFc*BoNTB-Master** est un vecteur d'expression codant le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique B, précédé du signal de sécrétion de l'érythropoïétine de souris et d'un signal Kozak gccacc. Il a été construit en insérant le fragment *SpeI-EcoRV* du

vecteur 042870pPCR-Script (Geneart) dans le vecteur d'expression pVax2 digéré par les mêmes enzymes.

Le plasmide pVaxFc*BoNTB est un vecteur d'expression codant le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique B. Il a été construit à partir du plasmide pVaxFc*BoNTB-Master duquel on a retiré le signal de sécrétion par digestion par *SpeI-EcoRI* puis traitement par Klenow et ligation.

Le plasmide pVaxFc*BoNTB-Variant est un vecteur d'expression codant le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique B, précédé du signal de sécrétion de la phosphatase alcaline sécrétée humaine et d'un signal Kozak gccacc. Sa construction en insérant le fragment *EcoRI-EcoRV* du vecteur 042870pPCR-Script (Geneart) dans le vecteur d'expression pVaxFc*BoNTA-Variant digéré par *EcoRI-PmeI* est actuellement en cours.

Toxine E

Le plasmide pVaxFcBoNTE contient le fragment FcBoNTE sous contrôle d'un promoteur CMV β . Ce fragment a été amplifié à partir du plasmide pCR2.1-FcToxE (fourni par Dr. M. Popoff, Pasteur) avec les amorces 5'cgggatcggccaccatgagaattaaaagtagttcagttttaaatatgag3' et 5'cgatatcttattttcttgccatccatggttcttcag3' puis digéré par *BamHI-EcoRV* et inséré dans le vecteur pVax2 digéré avec les mêmes enzymes.

Le plasmide 042869pPCR-Script a été synthétisé à notre demande par la société Geneart. Il contient le fragment C-terminal de la toxine botulique E optimisé pour un usage des codons chez la souris (espèce *Mus musculus*), précédé d'une séquence Kozak gccacc, du signal de sécrétion de l'érythropoïétine de souris et flanqué des sites de restrictions uniques *SpeI* en 5' et *EcoRV* en 3'. Ce fragment a été inséré dans le vecteur de clonage pPCR-Script (Stratagene).

Le plasmide pVaxFc*BoNTE-Master est un vecteur d'expression codant le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique E, précédé du signal de sécrétion de l'érythropoïétine de souris et d'un signal Kozak. Il a été construit en insérant le fragment *SpeI-EcoRV* du vecteur 042869pPCR-Script (Geneart) dans le vecteur d'expression pVax2 digéré par les mêmes enzymes.

Le plasmide pVaxFc*BoNTE est un vecteur d'expression codant le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique E. Il a été construit à partir du plasmide pVaxFc*BoNTE-Master duquel on a retiré le signal de sécrétion par digestion par *SpeI-EcoRI* puis traitement par Klenow et ligation.

Le plasmide pVaxFc*BoNTE-Variant est un vecteur d'expression codant le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique E, précédé du signal de sécrétion de la phosphatase alcaline sécrétée humaine et d'un signal Kozak. Il a été construit en insérant le fragment *EcoRI-EcoRV* du vecteur 042869pPCR-Script (Geneart) dans le vecteur d'expression pVaxFc*BoNTA-Variant digéré par *EcoRI-PmeI*.

1.5 Purification des plasmides

Une fois construits, ces plasmides ont été contrôlés par digestion enzymatique puis par séquençage. Les purifications de plasmides pour des essais sur cellules *in vitro* ont été effectués

avec un kit Midiprep (Promega). Les purifications de plasmides à grande échelle pour les administrations *in vivo* ont été effectuées à l'aide de kits QIAgen : EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAgen, ref 12362) pour des quantités d'ADN inférieures ou égales à 500 μ g, EndoFree Plasmid Mega Kit (QIAgen, ref 12381) pour des quantités allant jusqu'à 2,5mg et EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAgen, ref 12391) pour 10mg environ. Ces kits Endofree garantissent une quantité d'endotoxine inférieure ou égale à 0,1U/ μ g d'ADN pour éviter une réaction immunitaire des animaux. Par ailleurs pour avoir un meilleur niveau d'expression, il est important de vérifier sur gel que la solution d'ADN injectée contient majoritairement de l'ADN plasmidique sous forme superenroulée.

Vecteur	Source	Squelette	Promoteur	Gène d'intérêt
pCOR (pXL3296)	Aventis		CMV β	
pSL301	Invitrogen			
pCDNA3	Invitrogen		CMV	
pVax1	Invitrogen		CMV	
pVax2		pVax1	CMV β	
pTetSplice	Gibco BRL		promoteur TetP	
pTet-tTAk	Gibco BRL		promoteur TetP	tTAk
pXL3010		pCDNA3	CMV	hSeAP
pSeAPAS		pCOR	CMV β	hSeAP antisens
pTet-SeAPAS		pTetSplice	promoteur TetP	hSeAP antisens
pGJA14		pCOR	CMV β /promoteur TetP	hSeAP
pGJA15-2		pCOR	CMV β /promoteur TetP	hSeAP/hSeAP antisens
pXL3031		pCOR	CMV β	luc+
pLucAS		pCOR	CMV β	luc+ antisens
pTet-LucAS		pTetSplice	promoteur TetP	luc+ antisens
pXL3348		pCOR	CMV β	mEpo
pTet-EpoAS		pTetSplice	promoteur TetP	mEpo antisens
pTet-Epo		pTetSplice	promoteur TetP	mEpo
pEGFPC1	Clontech		CMV β	GFP
pEGFPC1-luc		pEGFPC1	CMV β	GFP-luc+
pC1-luc		pEGFPC1	CMV β	luc+
pDsRed	Clontech		CMV β	DsRed
pVaxLuc		pVax2	CMV β	luc+
pCR2.1-FcToxA	<i>Pasteur</i>	pCR2.1		FcBoNTA
pVaxFcBoNTA		pVax2	CMV β	FcBoNTA
040288pPCR-Script	<i>Geneart</i>	pPCRScript		Fc*BoNTA-Master
040278pPCR-Script Variant	<i>Geneart</i>	pPCRScript		Fc*BoNTA-Variant
pVaxFc*BoNTA-Master		pVax2	CMV β	Fc*BoNTA-Master
pVaxFc*BoNTA-Variant		pVax2	CMV β	Fc*BoNTA-Variant
pCR2.1-FcToxB	<i>Pasteur</i>	pCR2.1		FcBoNTB
<i>pVaxFcBoNTB</i>		<i>pVax2</i>	CMV β	<i>FcBoNTB</i>
042870pPCR-Script	<i>Geneart</i>	pPCRScript		Fc*BoNTB-Master
pVaxFc*BoNTB-Master		pVax2	CMV β	Fc*BoNTB-Master
<i>pVaxFc*BoNTB-Variant</i>		<i>pVax2</i>	CMV β	<i>Fc*BoNTB-Variant</i>
pCR2.1-FcToxE	<i>Pasteur</i>	pCR2.1		FcBoNTE
pVaxFcBoNTE		pVax2	CMV β	FcBoNTE
042869pPCR-Script	<i>Geneart</i>	pPCRScript		Fc*BoNTE-Master
pVaxFc*BoNTE-Master		pVax2	CMV β	Fc*BoNTE-Master
pVaxFc*BoNTE-Variant		pVax2	CMV β	Fc*BoNTE-Variant

TAB. 1 – Liste des plasmides utilisés.

2 Microbiologie

2.1 Génotypes et caractéristiques des souches d'*E. coli*

Les souches d'*E. coli* **DH5 α** de génotype F⁻, *endA*¹, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17(*r*_K⁻,*m*_K⁺), *supE*44, *relA*1, Φ 80 Δ *lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*), U169 et **INV α F'** de génotype F⁻, *endA*¹, *recA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17(*r*_K⁻,*m*_K⁺), *supE*44, *relA*1, F80*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*), U169 ont été utilisées dans les étapes de clonage.

La souche d'*E. coli* **XAC₋₁*pir*116** de génotype *ara* Δ (*lac-pro*)*gyrA*, *argE*_{am}, *rpoB*, *thi*, *rif*, *uidA*(Δ MluI) : :*pir*-116F' (*proB*⁺*lacI*₃₇₃*lacZ*_{U118am}) a été utilisée lors des clonages spécifiques des pCOR.

2.2 Milieux de culture

Le milieu complet LB (milieu Luria Bertani; bacto-tryptone 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 1%) et le milieu minimum M9 [268] ont été utilisés. Les milieux gélosés (sur les boîtes de Petri) ont été obtenus par addition de 15g d'agar par litre de milieu. De plus, si nécessaire, ces milieux ont été supplémentés en antibiotiques tels que l'ampicilline à 100mg/l ou la kanamycine à 50mg/l. Le substrat chromogène X-Gal a été utilisé à la concentration de 40mg/l.

2.3 Préparation de bactéries compétentes

Une préculture de bactéries est réalisée dans 5mL de milieu LB et conduite pendant une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, 1ml est prélevé et mis en culture dans 100ml de milieu LB pendant 2 heures environ à 37°C. Les bactéries sont alors en phase exponentielle de croissance. Lorsque la DO₆₀₀ est entre 0,3 et 0,8 max (idéal entre 0,5 et 0,6), les bactéries sont placées 15 minutes à 4°C. La culture est ensuite centrifugée à 4°C pendant 20 minutes à 3000trs/min. Après élimination du milieu LB, les bactéries sont remises en suspension dans 50ml d'une solution de CaCl₂ 100mM froid puis laissées 20 minutes sur glace. La solution de CaCl₂ perméabilise les membranes bactériennes. A l'issue de cette incubation, les bactéries sont fragilisées et donc à manipuler avec précaution. Elles sont centrifugées 20 minutes à 3000 trs/min. Le culot est remis en suspension dans 1ml d'une solution de CaCl₂ 100mM froid et mis en incubation 30 minutes sur glace. Les bactéries ainsi préparées sont dites compétentes c'est-à-dire capables d'incorporer de l'ADN exogène. Les bactéries compétentes peuvent ensuite être conservées à -80°C en ajoutant 0,35ml de glycérol par ml de cellules.

2.4 Transformation de bactéries compétentes par choc thermique

Bactéries *E. Coli* XAC₋₁*pir*116

20 à 100ng de plasmide pCOR sont ajoutés à 100 μ l de bactéries compétentes XAC₋₁*pir*116. Après une incubation d'une heure sur glace, les bactéries fragilisées sont placées pendant 3 minutes à 42°C. Ce choc thermique crée des pores dans les membranes bactériennes par lesquels l'ADN d'intérêt peut entrer. 500 μ l de milieu LB sont ajoutés. Une incubation d'une heure à 37°C permet la reprise bactérienne. Après centrifugation pendant 3 minutes à 2500 trs/min on effectue deux lavages successifs de chaque transformation dans 300 μ l de MgSO₄ 10mM. Les bactéries sont enfin remises en suspension dans 300 μ l de MgSO₄ 10mM puis étalées sur milieu minimum M9/X-gal de façon stérile. Les boîtes de Petri sont mises en incubation 36 heures à 37°C. Le milieu M9 a été supplémenté en un substrat incolore de la β -galactosidase (X-gal).

Les bactéries XAC₋₁*pir116* expriment la β -galactosidase qui convertit X-gal en un produit bleu. Cette couleur bleue permet la détection des clones recombinants.

Bactéries INV α F' et DH5 α

Un tube de 50 μ l de bactéries compétentes (conservées à -80°C) est placé dans la glace. Pour les bactéries INV α F' on peut ajouter 2 μ l de β -mercaptoéthanol 0,5M. Puis on mélange doucement l'ADN plasmidique avec les bactéries compétentes. Après une incubation d'une demi-heure sur glace, les bactéries fragilisées sont placées pendant 30 secondes à 42°C. Ce choc thermique crée des pores dans les membranes bactériennes par lesquels l'ADN d'intérêt peut entrer. 250 μ l de milieu LB sont ajoutés. Une incubation d'une heure à 37°C permet la reprise bactérienne. Puis chaque transformation est étalée sur milieu LB de façon stérile. Les boîtes de Petri sont mises en incubation 12 heures à 37°C.

2.5 Transformation de bactéries compétentes par électroporation

Afin d'améliorer l'efficacité de transformation on peut utiliser la technique d'électroporation. Cette technique consiste à utiliser de hauts voltages pour créer des pores transitoires dans la membrane cellulaire. Une préculture de bactéries est réalisée dans 50ml de milieu LB et conduite pendant une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, 2,5ml de cellules sont prélevées et mises en culture dans 250ml de milieu LB pendant 2 à 3h à 37°C. La culture est centrifugée à 4°C pendant 10 minutes à 5000 trs/min. Après élimination du milieu LB, les bactéries sont remises en suspension dans 250ml de solution de WB froid (10% glycérol, 90% eau distillée, v/v) puis centrifugées 15 minutes à 2700g. Cette opération est répétée une deuxième fois. Le culot est remis en suspension dans 1ml de WB. Les bactéries sont alors prêtes pour l'électroporation. On prépare 40 μ L de bactéries compétentes dans une cuve (BTX Disposable Cuvettes, 2mm de largeur) sur de la glace. Puis on mélange doucement l'ADN avec les bactéries compétentes. On applique ensuite un choc électrique de 5ms à 2500 volts (MicroPulserTM, BioRad). Les bactéries sont ensuite remises en suspension dans du milieu LB pendant une heure à 37°C avant d'être étalées sur boîte de Petri et mises en incubation 12 heures à 37°C.

3 Biologie moléculaire

3.1 Electrophorèse analytique et préparative des acides nucléiques

Les fragments d'ADN sont analysés selon leur poids moléculaire par migration sur gel d'agarose 1% dans du tampon de migration TBE 1X (Tris-borate EDTA; Tris-HCl 90 mM; acide borique 90 mM; EDTA 2,5 mM; pH 8). Des marqueurs de poids moléculaire permettent de déterminer la taille approximative des fragments analysés. A pH=8 (pH de la solution tampon), l'ADN est chargé négativement et migre vers l'anode. La vitesse de migration est inversement proportionnelle au logarithme de sa longueur. Après migration, les acides nucléiques sont colorés au bromure d'éthidium (BET) et visualisés sous éclairage UV.

3.2 Extraction d'ADN

Ce protocole est utilisé pour extraire l'ADN génomique d'un culot de cellules ou d'un muscle de souris. Le tissu est digéré une nuit à 55°C à l'aide de protéinase K (30 μ l d'une solution à 10mg/ml pour un muscle) dans une solution de lyse (Tris 50mM, EDTA, 5mM, SDS 1%, NaCl 0,2M). Pour éliminer l'ARN on ajoute ensuite 20 μ l d'une solution à 10mg/ml de RNase

1 à 2 heures à 37°C. Les débris protéiques sont ensuite éliminés par plusieurs extractions phénol/chloroforme puis chloroforme uniquement. On précipite ensuite l'ADN dans une solution acétate de sodium 3M/éthanol absolu. Le culot est lavé avec de l'éthanol 70% à -20°C et remis en suspension dans de l'eau.

3.3 Extraction d'ARN

Remarque : tout le matériel et les solutions utilisés pour l'extraction des ARN doivent être réservés à la manipulation d'ARN et dépourvus de ribonucléases (RNases).

Les ARN totaux des cellules ou des muscles squelettiques de souris sont extraits à partir d'un protocole inspiré de la méthode développée par Chomczynski and Sacchi [273] en utilisant le TRIzol[®] LS Reagent (GibcoBRL, Life Technologies). Brièvement, les muscles ou cellules sont directement homogénéisés ou lysés dans le TRIzol : un muscle encore congelé est homogénéisé dans 1ml de TRIzol à l'aide d'un Ultraturax Diax 600 (Heidolf) ou $5 \cdot 10^6$ cellules, après un lavage au PBS, sont remises en suspension dans 1ml de TRIzol. L'addition de chloroforme (200 μ l/ml de TRIzol) suivie d'une centrifugation (15 minutes à 4°C à 12000g) permet la séparation de la phase aqueuse qui contient les ARN de l'interphase et de la phase organique qui contient l'ADN et les protéines. Les ARN sont ensuite précipités 10 minutes à température ambiante avec de l'isopropanol (0,5 ml/ml de TRIzol). Après centrifugation 10 minutes à 12000g et lavage à l'éthanol 75%, le culot d'ARN est séché puis remis en suspension dans un petit volume d'eau. Les solutions d'ARN doivent être conservées à -80°C. La non dégradation des ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

3.4 Traitement à la DNase des ARN

L'élimination des ADN résiduels (génomique et plasmidique) est effectuée par incubation pendant 30 minutes à 37°C de 5 μ g d'ARN total avec 1U de DNase I RNase free (Roche) dans un tampon (0,1M C₂H₃O₂Na pH 5,2; 5mM MgSO₄) complété à 20 μ l avec de l'eau dépourvue de RNase. A la fin de la réaction, l'enzyme est éliminée par une extraction phénol/chloroforme (mélange d'un volume de solution d'ARN avec un volume de solution v/v phénol/chloroforme puis centrifugation 12 minutes à 4°C à 12000g et prélèvement de la phase aqueuse) suivie d'une extraction chloroforme puis d'une précipitation de l'ARN dans une solution d'acétate de sodium 3M/éthanol absolu. Le culot d'ARN est remis en suspension dans 10 μ l d'eau. La dégradation des ADN est vérifiée par PCR directement sur 0,5 μ l d'ARN total en utilisant des amorces pour le gène de l'actine musculaire de souris (sens : 5'gctcgtcgtcgcacaacggctc3'; antisens : 5'caacatgatctgggtcatcttctc3').

3.5 Quantification de l'ARN et de l'ADN

La concentration d'une solution d'ARN ou d'ADN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman, DU 530). Une densité optique de 1 correspond à une concentration de 40 μ g/ml d'ARN simple brin, 50 μ g/ml d'ADN double brin ou 37 μ g/ml d'ADN simple brin. Le degré de pureté de l'échantillon est défini par le rapport des densités optiques 260nm/280nm qui doit être le plus proche possible de 2.

3.6 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Différentes polymérases ont été utilisées pour les réactions de PCR selon le but final de l'amplification (tableau 2). De manière générale, l'amplification de séquences d'ADN par PCR est effectuée à partir d'ADN matriciel dans un volume réactionnel de 50 μ l contenant du tampon de réaction PCR dilué 1X, 200nM de chaque amorce (spécifiques de la séquence à amplifier), 0,1 mM de dNTPs (mélange contenant 10mM de chaque nucléotide tri-phosphate), et 0,5U de polymérase. Du MgCl₂ peut être ajouté si nécessaire. Les PCR ont été conduites dans un Minicycler^{IM} (MJ research) selon le programme suivant : dénaturation de 10 minutes à 94°C ; 10 à 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C, une étape d'hybridation à T_m et une étape de polymérisation de x secondes à 72°C (x étant proportionnel à la taille du fragment souhaité avec en moyenne 10 secondes pour 100pb) ; polymérisation finale à 72°C. La température d'hybridation T_m est déterminée en fonction des amorces choisies. Les produits PCR sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Enzyme	Fournisseur	Application
rTaq	Takara	amplifications classiques
AmpliTaq	Applied Biosystem	amplifications classiques
Vent	Takara	amplifications haute fidélité
Accute	Bioline	amplifications haute fidélité
ELONGase	Invitrogen	amplifications de longs fragments (≤ 30 kb)

TAB. 2 – *Différentes polymérases utilisées.*

D'autres protocoles plus complexes de PCR ont été utilisés et sont décrits ci-dessous (PCR en temps réel, PCR nichée, RAIC PCR).

3.7 RT-PCR

La synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée en utilisant le kit Superscript^{IM} II RNase H- Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Life Technologies). Cinq μ g d'une solution d'ARN total sont mis en incubation à 70°C pendant 10 minutes avec 500 ng d'amorce (dT)20 ou d'amorce antisens spécifique de la séquence recherchée (tableau 3) dans un volume final de 12 μ l puis rapidement refroidis sur glace. On ajoute ensuite 4 μ l de 5x "first strand reaction buffer", 2 μ l de 0,1M DTT et 1 μ l de dNTP (mélange contenant 10mM de chaque nucléotide tri-phosphate). La réaction de transcription inverse est débutée après ajout de 1 μ l de transcriptase inverse Superscript II (200U/ μ l) puis mise en incubation à 42°C pendant 50 minutes. Enfin, une incubation de 10 minutes à 70°C arrête la réaction en inactivant l'enzyme. Une PCR est ensuite réalisée avec 2 μ l de mélange de transcription inverse en utilisant les deux amorces sens et antisens. Les produits de PCR sont ensuite séparés sur un gel d'agarose. Si nécessaire les produits de PCR séparés peuvent être ensuite transférés sur une membrane Hybond+ (Amersham Pharmacia Biotech). La membrane est ensuite hybridée avec un oligonucléotide spécifique de la séquence recherchée marqué au ³²P, lavée et exposée par autoradiographie.

3.8 PCR en temps réel

La PCR en temps réel vise à déterminer avec précision le cycle à partir duquel le produit de PCR peut être détecté. L'ordre d'apparition du produit de PCR dans différents échantillons

Gène	Fragment PCR	Amorce	Séquence	Position
hSeAP	418	sens	5'cgatcatgttcgacgacgcc3'	1042
		antisens	5'ccaggtcgcaggcggttag3'	1460
FcBoNTA	259	sens	5'tgcatcacaggcaggcgttag3'	980
		antisens	5'cccatgagcaacccaaagtcc3'	1239
Fc*BoNTA	703	sens	5'gcctgaactacggcgagatcatctgg3'	322
		antisens	5'gatctccagggcgctcaggatctt3'	1025
Fc*BoNTB	600	sens	5'gagcaacatcgaggagcgg3'	1401
		antisens	5'ctgccagttgcagcccagct3'	2021
FcBoNTE	427	sens	5'atgagaattaaaagtagttcagtt3'	2764
		antisens	5'tataatcagaaataccatttgc3'	3166
Fc*BoNTE	428	sens	5'atgcgatcaagagcagcagc3'	764
		antisens	5'gatgtaatcgctgatgccgttg3'	1192
Actine de souris	308	sens	5'gctcgtcgtcgacaacggctc3'	94
		antisens	5'caacatgatctgggtcatcttctc3'	446

TAB. 3 – *Amorces utilisées pour les RT-PCR.*

reflète la quantité de produit matriciel initialement présent dans le mélange réactionnel. Le dispositif expérimental disponible au laboratoire est un Light Cycler[®] de Roche Molecular Biochemicals. Le SYBR Green[®] I, fluorophore présent dans le mélange réactionnel, est excité à 485nm et émet une fluorescence verte à 520 nm. Le SYBR-Green[®] I est une molécule qui se fixe dans le petit sillon de l'hélice de l'ADN. L'intensité de son rayonnement émis augmente significativement lorsqu'il est fixé à de l'ADN double brin. Une lecture de la fluorescence au cours de chaque cycle permet de suivre la progression de l'amplification et donne une estimation de la quantité de produit PCR formé en temps réel. La PCR est réalisée avec le kit Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals) en présence des amorces spécifiques de l'ADN à amplifier que nous avons choisies à l'aide du logiciel Oligo6.

Gène	Fragment PCR	Amorce	Séquence	Position
Luc	216pb	sens	5'ggacatcacttacgtgagtac3'	146
		antisens	5'cgaaatgccatactgttg3'	362
Kana	133pb	sens	5'tggagaggctattcgcta3'	46
		antisens	5'cagttcattcagggcacc3'	179
FcBoNTA	127pb	sens	5'aagacttttggggtgattattt3'	686
		antisens	5'tgttttagtcattacgtacct3'	813
Fc*BoNTA	154pb	sens	5'gcaacaaggataacatcgtg3'	896
		antisens	5'gctcttcaccaccact3'	1050

TAB. 4 – *Amorces utilisées pour la PCR en temps réel.*

Les réactions de PCR sont préparées dans des capillaires en verre avec 5 μ l d'un mélange qui contient la Taq polymérase, les nucléotides, le fluorochrome SYBR-Green I, 10pmol de chaque amorce et 5 μ l de l'ADN d'intérêt ou de ses dilutions. Trente-deux réactions de PCR peuvent être exécutées en parallèle dans le carrousel selon le programme suivant : 40 cycles comprenant une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 6 secondes à 68°C

et une étape de polymérisation de 6 secondes à 72°C avec détection de la fluorescence à la fin de chaque cycle. A l'issue du dernier cycle, les échantillons sont chauffés à 95°C et refroidis rapidement à 65°C pendant 30 secondes. Ensuite, la température est augmentée progressivement (0,1°C/seconde) et la fluorescence mesurée en continu afin d'obtenir la courbe de fusion des produits PCR. L'analyse des courbes d'amplification et de fusion des réactions est menée à l'aide du logiciel LightCycler.

3.9 Traitement au bisulfite

Le traitement au bisulfite permet la conversion de toutes les cytosines d'un brin d'ADN en uracile sauf les cytosines méthylées. Dans un tube à bouchon vissé on place 5µg d'ADN à traiter dans 54µL d'eau distillée. L'ajout de 6µL de soude 3N pendant 15 minutes à 37°C permet dans une première étape de dénaturer les deux brins d'ADN. La réaction peut ensuite avoir lieu en ajoutant 431µL d'une solution d'un mélange de bisulfite de sodium 3,6M et d'hydroquinone 1mM, pendant 12 à 14 heures. L'ADN est ensuite lavé avec le kit Promega Wizard Prep (Qiagen) , on obtient alors un volume final de 50µL. On ajoute alors 6µL de soude 3N pendant 15 minutes à 37°C puis 26µL de NH₄OAc 10M et 300µL d'éthanol 95% à -20°C pendant 20 minutes pour précipiter l'ADN. Le culot d'ADN est récupéré par centrifugation à 4°C pendant 30 minutes et remis en suspension dans 100µL d'eau distillée.

3.10 PCR nichée après traitement au bisulfite

L'amplification par PCR est effectuée à partir de 1µL d'ADN plasmidique traité au bisulfite dans un volume réactionnel de 50µL contenant du tampon de réaction PCR 10X (PE Applied biosystems), 200nM de chaque amorce (décrites dans le tableau 5), 0,1mM de dNTPs (mélange contenant 10mM de chaque nucléotide tri-phosphate), 1µL de MgCl₂ 25mM et 0,5µL de AmpliTaq DNA polymerase (5U/µL) (PE Applied biosystems). Les PCR ont été conduites dans un MinicyclerTM (MJ research) selon le programme suivant : dénaturation de 5 minutes à 95°C ; 35 cycles comprenant une étape de dénaturation de 1 minute à 95°C, une étape d'hybridation de 1 minute à 50°C et une étape de polymérisation de 1 minute à 72°C ; polymérisation finale de 5 minutes à 72°C.

amorce	séquence	position sur le pXL3010
OUT1	5'ataaattagtaaaataggtt3'	5351 (sens)
OUT2	5'atatctacaaaattccaacacact3'	744 (antisens)
IN1	5'tgttaggtgtagaatattttttat3'	5385 (sens)
IN2	5'aaacttaaattctccctataataa3'	686 (antisens)

TAB. 5 – *Amorces utilisées pour la PCR nichée sur le pXL3010 traité au bisulfite.*

3.11 RAIC PCR (Repeat-Anchored Integration Capture)

La RAIC PCR se décompose en trois PCR successives que nous noterons PCR1, PCR2 et PCR3, alternées avec des étapes de traitements spécifiques. Les trois PCR suivent toutes un protocole semblable sauf PCR1 qui ne contient que 10 cycles au lieu de 40 cycles pour PCR2 et PCR3 : entre 0,1 et 1µg d'ADN sont mélangés avec 4µL de dNTP 10mM et 250ng de chaque amorce (décrites dans le tableau 6). Ce mélange noté mix1 est ajusté à un volume de 20µL avec

de l'eau. Un deuxième mélange est préparé (mix2) contenant $3\mu\text{l}$ de tampon A (ELONGase amplification system, Invitrogen), $7\mu\text{l}$ de tampon B (ELONGase amplification system, Invitrogen) et 5 (pour la PCR1) ou 1,5U (pour PCR2 et PCR3) d'enzyme ELONGase. Le volume du mix2 est ajusté à $30\mu\text{l}$ d'eau. Le mix1 est ajouté au mix2. La PCR est conduite dans un Minicycler^{IM} (MJ research) selon le programme suivant : hybridation de 30 secondes à 70°C ; dénaturation de 1 minute à 94°C ; 10 ou 40 cycles comprenant une étape de dénaturation de 15 secondes à 94°C , une étape d'hybridation de 30 secondes à 65°C et une étape de polymérisation de 18 minutes à 72°C ; polymérisation finale de 12 minutes à 72°C .

Cible ADN	Amorce	Séquence
B1 murin	B1	5'caguucaagugucugcugacgccuacgcaggcggauuucugaguucgagg3'
	Double-Tag-B1	5'caguucaagugucugcugacgccuacgcagaucaugcaggcggauuucugaguucgagg3'
	Tag	5'caagtgtctgtctgacgcctacg3'
	Tag-niché	5'tgacgcctacgcagatcatgc3'
pC1-luc	6-BIOT	5'gcgaggtatgtagcggtgcta3'
	5-BIOT	5'gtggtggcctaactacggctacac3'
	4PC1luc	5'tgctgaagccagttaccttcgg3'
	3PC1luc	5'aaacaaccaccgctgtagcg3'
	2PC1luc	5'tcacttgccagcgccta3'
	1PC1luc	5'ttagtgctttacggcacctcgac3'

TAB. 6 – *Amorces utilisées pour la PCR RAIC. Les amorces 6-BIOT et 5-BIOT sont biotinylées en 5', et les amorces B1 et Double-Tag-B1 ont été modifiées pour porter des Uraciles à la place des Thymines.*

En pratique, l'ensemble de l'essai se déroule de la façon suivante : la PCR1 (10 cycles) est réalisée sur $0,5\mu\text{g}$ d'ADN avec les amorces B1 (ou Double-Tag-B1) et 6-BIOT. A l'issue de cette PCR le produit de PCR est purifié à l'aide d'un kit Wizard PCR prep (Promega, Ref. A7170). Sur les $50\mu\text{l}$ récupérés, $26\mu\text{l}$ de la solution sont traités avec 1U de Uracil-DNA Glycosylase (UDG, NEB, M028S) et $3\mu\text{l}$ de tampon 10X (UDG reaction buffer, NEB, tampon 1X :20 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA ; 1 mM dithiothreitol ; pH 8,0 à 25°C) pendant 30 minutes à 37°C . Pour isoler les fragments biotinylés, chaque $30\mu\text{l}$ traités à la UDG sont mélangés avec $30\mu\text{g}$ de billes magnétiques recouvertes de streptavidine (Dynabeads[®] kilobaseBINDER^{IM} Kit : Dynabeads[®] M-280 Streptavidin, DYNAL Biotech) mises en suspension dans $30\mu\text{l}$ de Binding Solution (DYNAL Biotech). Le mélange est mis en incubation une heure à température ambiante sous agitation pour garder les billes en suspension. Un lavage initial est ensuite effectué avec une solution 10mM TrisHCl ; 1mM EDTA ; 2M NaCl. Pour effectuer ce lavage on utilise un portoir DYNAL MPC[®]-E (DYNAL Magnetic Particle Concentrator-E, ref. 120.04) contenant dans son socle un aimant pour attirer les billes sur la paroi du tube. Suite à ce lavage, on dénature l'ADN double brin dans une solution de NaOH 0,1N pendant 10 minutes. On retire ensuite le surnageant qui contient les brins non biotinylés. On neutralise ensuite avec 0,2M de TrisHCl (pH7,5) et les billes sont remises en suspension dans $10\mu\text{l}$ d'eau. On utilise ces $10\mu\text{l}$ pour la PCR2.

La PCR2 (40 cycles) est réalisée sur les $10\mu\text{l}$ d'ADN précédents avec les amorces Tag et 5-BIOT. Pour isoler les fragments biotinylés, $40\mu\text{g}$ de billes magnétiques recouvertes de streptavidine en suspension dans $40\mu\text{l}$ de Binding Solution sont mélangés et mises en incubation une heure à température ambiante sous agitation pour garder les billes en suspension. Un lavage initial est ensuite effectué avec une solution 10mM TrisHCl ; 1mM EDTA ; 2M NaCl. Suite à ce lavage, on dénature l'ADN double brin dans une solution de NaOH 0,1N pendant 10 minutes. On retire ensuite le surnageant qui contient les brins non biotinylés. On neutralise ensuite avec

0,2M de TrisHCl (pH7,5) et les billes sont remises en suspension dans 30 μ l d'eau. On utilise uniquement 1 μ l pour la PCR3.

La PCR3 (40 cycles) est réalisée sur 1 μ l d'ADN avec les amorces Tag (ou Tag-nichée si l'amorce Double-Tag-B1 a été utilisée en PCR1) et 4PC1luc.

A l'issue de cette dernière PCR on dépose le produit sur un gel d'agarose pour visualiser les fragments obtenus. Ce produit peut ensuite être séquencé.

3.12 Séquençage

Le séquençage est effectué dans le Service de Séquence de l'Institut Cochin. La technologie utilisée repose sur la méthode de SANGER ou méthode des interrupteurs de chaîne, adaptée à la fluorescence. Deux kits sont utilisés pour le séquençage : le kit Big Dye Terminator[®] version2 (Applied Biosystems) avec la polymérase Taq polymérase FS[®] (FS=Fluorescent Sequencing) ou le kit DYEnamic ET Terminator (Amersham) avec la polymérase Thermo-Sequenase II. Les différentes étapes de séparation et d'analyse sont réalisées sur l'Analyseur Génétique ABI3100 (Applied Biosystem). Enfin les séquences obtenues sont étudiées avec le logiciel Chromas 2.3 (visualisation des pics de fluorescence) et le logiciel AlignX (alignement de séquences), composante du logiciel Vector NTI (répertoire et analyse de séquences, Invitrogen).

4 Biologie cellulaire

4.1 Culture cellulaire

Les cellules couramment utilisées lors des essais *in vitro* sur cellules sont :

- **Cellules adhérentes NIH/3T3 (ATCC CRL-1658)** : fibroblastes de souris cultivées dans un milieu Dulbecco modifié avec du glucose 4,5g/l (DMEM-Gibco), de la glutamine (2mM), des antibiotiques (pénicilline 100U/ml et streptomycine 100 μ g/ml) et 10% de sérum de veau.
- **Cellules adhérentes B16 (ATCC CRL-6323)** : mélanome de souris cultivées dans un milieu Dulbecco modifié avec du glucose 4,5g/l (DMEM-Gibco), de la glutamine(2mM), des antibiotiques (pénicilline 100U/ml et streptomycine 100 μ g/ml) et 10% de sérum de veau foetal.

Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture de 75cm² avec 25ml de milieu de culture dans des étuves à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂ et 95% d'humidité. La confluence étant atteinte en deux ou trois jours, les cellules sont passées deux fois par semaine environ.

4.2 Transfection *in vitro*

Le jour précédent la transfection, les cellules sontensemencées dans des plaques 6, 12 ou 24 puits selon le but de la transfection (tableau 7) dans 1 ou 2 ml de milieu par puits.

But de la transfection	Plaque	Nombre de cellules par puits
Dosages biochimiques	24 puits	40-50 000
Immunofluorescence	12 puits	60-70 000
Western-Blot, RT-PCR	6 puits	120-150 000

TAB. 7 – *Conditions d'ensemencement des cellules.*

Deux liposomes ont été principalement utilisés pour les transfections *in vitro* : le RPR 120535/DOPE (chlorhydrate de dioctadecyl carbamoylmethyl-acetamido spermine) et le RPR 209120/DOPE, une lipopolyamine développée au laboratoire [274]. L'ADN plasmidique et le lipide cationique sont dilués dans une solution 20mM NaHCO₃, 150mM NaCl [275] pour le RPR 120535 ou NaCl 150mM seul pour le RPR 209120/DOPE. Cette solution permet l'agrégation des complexes lorsque la solution de plasmide et la solution de lipide cationique sont mélangées volume à volume dans un rapport 6 nmoles de RPR 120535/ μ g d'ADN (100 μ l/puits) ou 4 nmoles de RPR 209120/ μ g d'ADN. Les complexes sont mis en incubation 10 minutes à température ambiante et sont ensuite dilués 10 fois dans du milieu de culture. Le milieu de culture des cellules est ensuite remplacé par 1 ou 2ml de milieu contenant les complexes lipides/ADN. Les plaques de transfection sont mises en incubation dans les étuves pendant 24 ou 48 heures.

Si nécessaire, la tétracycline est ajoutée à une concentration finale de 1 μ g/ml.

Toutes les transfections ont été réalisées en triplicate et reproduites au moins deux fois. La quantité totale d'ADN transfecté reste constante, en ajoutant si nécessaire les plasmides pXL3296 ou psl301 (vecteurs vides avec ou sans promoteur).

5 Biochimie

5.1 Dosages biochimiques

Dosage des protéines (BCA)

La concentration en protéines d'un échantillon est déterminée sur 10 μ l de surnageant de lysat cellulaire (ou d'une dilution) dans une plaque transparente 96 puits : l'échantillon est réduit 30 minutes à 37°C par l'action de 10 μ l d'iodoacétamide 100mM dans un tampon Tris 100mM pH 8,2 pour neutraliser le DTT présent dans le tampon de lyse, puis dosé à l'aide du kit BCA (Pierce) selon le protocole du fournisseur (Réactif BCA A : réactif de détection BCA, carbonate de sodium, bicarbonate, tartrate de sodium dans 0,1M NaOH. Réactif BCA B : 4% CuSO₄ aqueux 5H₂O). Brièvement, ce dosage est basé sur le principe de la réaction de Biuret qui consiste en la formation d'un complexe pourpre entre le Biuret (NH₂-CO-NH-CO-NH₂) et deux liens peptidiques consécutifs en présence de cuivre en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique (BCA) réagit avec les complexes de Cu²⁺ et de protéines. En formant de tels complexes il prend une couleur pourpre typique détectable à 562 nm. Pour déterminer la concentration en protéine d'un échantillon on réalise en parallèle une gamme standard avec de la BSA (Bovine Serum Albumine) (0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 μ g de protéine/10 μ l) dans du tampon de lyse 1X. L'absorbance est mesurée à 562nm dans un lecteur de plaque.

Dosage de l'activité phosphatase alcaline humaine

La quantité de phosphatase alcaline humaine (hSEAP) produite et sécrétée par un muscle ou des cellules est évaluée par le dosage de son activité enzymatique à l'aide du kit commercial Tropix[®] Phospha-Light^{IM} System (Applied Biosystems). La phosphatase alcaline provoque la déphosphorylation de son substrat qui devient alors luminescent [276]. L'émission de lumière mesurée est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans l'échantillon. Le dosage de l'activité phosphatase alcaline sécrétée humaine (hSEAP) est effectué sur 10 μ l de sérum de souris ou 15 μ l de surnageant de culture. Les sérums/surnageants sont dilués au 10^e dans le tampon de dilution 1X dans une plaque 96 puits. L'activité phosphatase alcaline endogène est inactivée par une incubation à 65°C pendant 30 minutes suivie par 5 minutes sur la glace. En

effet la phosphatase alcaline sécrétée humaine (hSeAP) est thermorésistante [270]. Dans une plaque noire 96 puits, 25 μ l de chaque échantillon sont déposés et mis en incubation pendant 5 minutes à température ambiante avec 25 μ l de tampon glycine (100mM glycine ; 1mM MgCl₂ ; 1mM ZnCl₂). La réaction chimioluminescente est déclenchée par l'addition de 25 μ l de tampon de réaction contenant le substrat CSPD[®] et l'amplificateur Emerald^{IM}. L'émission de photons atteint son maximum après une incubation à température ambiante et à l'obscurité de 20 minutes. Elle est mesurée (1 seconde/puits) dans un luminomètre à plaque Victor² (Wallac, USA). Une solution stock de SEAP humaine recombinante (synthétisée et purifiée par Gencell, Hayward, USA) permet d'obtenir une gamme étalon dont les concentrations s'étendent de 0 à 30ng/ml. Les dilutions de la gamme de dix en dix sont effectuées dans du sérum de souris naïves dilué au 10^e.

Dosage de l'activité luciférase

Dans le muscle tibial cranial de souris Chaque muscle est broyé dans 1 ml de tampon de lyse 1X (25mM Tris-phosphate pH7,8 ; 2mM DTT ; 2mM acide 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacétique ; 10% glycérol, 1% Triton[®] X-100 préparé à partir de Cell Culture Lysis Reagent 5X, Promega) supplémenté d'un cocktail d'antiprotéases (une tablette d'inhibiteur de protéase dissoute dans 50 ml de tampon de lyse 1X ; Complete/Protease Inhibitor Cocktail tablets, Roche Diagnostics). Pour éviter une dégradation de la luciférase par la chaleur, les tubes sont placés, immédiatement après l'homogénéisation, quelques secondes sur la glace. Le broyat est ensuite centrifugé 10 minutes à 4°C à 12000 trs/min. La quantité de luciférase produite par le muscle est évaluée par le dosage de son activité enzymatique à l'aide du kit Luciferase Assay System (Promega). Une réaction d'oxydation se produit lorsque la luciférase est en contact avec son substrat (la luciférine contenue dans le tampon de réaction du kit). Cette réaction entraîne l'émission de photons, facilement quantifiable. Pour chaque échantillon 10 μ l de surnageant sont déposés en duplicate dans une plaque blanche 96 puits. Le luminomètre à plaque Victor² (Wallac, USA) permet l'injection automatique de 50 μ l de substrat par puits et la détection immédiate de l'émission de lumière (cumulée pendant les 10 secondes qui suivent l'injection).

Dans les cellules transfectées Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et lysées 5 minutes à température ambiante sous l'action de 200 μ l du tampon de lyse 1X (cf ci-dessus). Le tapis cellulaire est gratté et centrifugé 5 minutes à 12000g. La mesure de l'activité luciférase est réalisée comme indiqué ci-dessus. Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à la concentration de protéines mesurées par puits qui reflète le nombre de cellules récupérées.

5.2 Dosages ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay)

Dosage des anticorps anti-FcBoNT

La protéine FcBoNT (fournie par l'Unité Bactérie Anaérobie et Toxine, Dr. M. Popoff, Institut Pasteur) est diluée dans du tampon carbonate à la concentration de 1 μ g/ml, puis déposée à raison de 100 μ l par puits dans une plaque NUNC immuno et laissée une nuit à température ambiante. Les puits sont lavés trois fois dans du PBS-tween20 (0,1%, p/v) afin d'éliminer la protéine non adsorbée, la saturation des sites aspécifiques est ensuite effectuée avec une solution PBS-tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%) mise en incubation 30 minutes à température ambiante. Les puits sont à nouveau lavés plusieurs fois dans du PBS-tween20 (0,1%) puis les sérums de souris prélevés sont déposés sur la plaque en 6 dilutions de 2 en 2 dans du PBS-tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%, p/v),

la dilution la moins forte étant 1/100^e. L'incubation est effectuée à 37°C pendant deux heures. Les puits sont à nouveau lavés plusieurs fois dans du PBS-tween20 (0,1%) puis mise en incubation une heure avec les anti-immunoglobulines de souris couplées à la peroxidase (Amersham pharmacia biotech, NXA931) diluées au 2000^e dans une solution de PBS-tween20 (0,1%). Les puits sont lavés à nouveau, la révélation se fait ensuite en déposant une solution d'Ortho-phénylènediamine (1mg/ml) dans du tampon citrate avec 20 μ l de H₂O₂. Au bout de quelques minutes les puits se colorent. La réaction est arrêtée par ajout de 50 μ l par puits de HCl 3N. On mesure l'absorbance à 492nm dans un lecteur de plaque.

NB : pour le dosage des anticorps anti-FcBoNT chez le lapin, le protocole est le même, sauf que l'anticorps secondaire est un anticorps anti-immunoglobuline de lapin biotinylé (Abcys, BA-1000, 1,5 μ g/ μ l) dilué à 4 μ g/ml dans une solution de PBS-tween20 (0,1%).

NB : pour le dosage des sous-types IgG1 et IgG2a chez la souris, le protocole est le même sauf que les anticorps secondaires sont des anticorps biotinylés anti-immunoglobuline IgG1 ou IgG2a de souris (Abcys, LO-MG1-2 Biotin, 1mg/ml et LO-MG2a-9 Biotin, 1mg/ml) dilués respectivement à 250ng/ml et 500ng/ml dans une solution de PBS-tween20 (0,1%). Une étape supplémentaire est donc nécessaire en incubant les puits 30 minutes avec de la streptavidine couplée à la peroxydase diluée au 400^e dans du PBS.

Calcul du titre en anticorps anti-FcBoNT

Le titre en anticorps d'un sérum correspond à l'inverse de la dilution pour laquelle on a une différence d'absorbance de 0,3 entre le sérum des souris naïves et ce sérum (figure 2). Pour calculer les titres nous avons considéré qu'entre deux dilutions successives la courbe donnant la DO en fonction de la dilution était une droite. On détermine donc l'abscisse du point situé à 0,3 au dessus de la courbe des sérums des souris naïves. L'inverse de cette dilution nous donne le titre en anticorps.

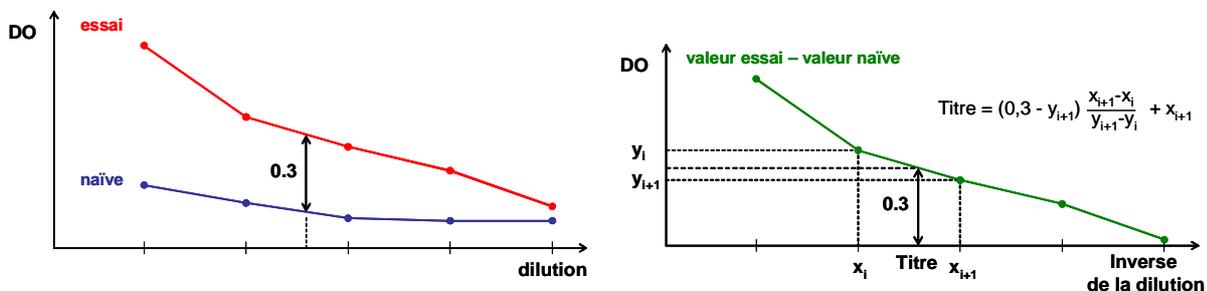


FIG. 2 – Calcul du titre en anticorps.

Dosage des anticorps anti-luciférase

La luciférase recombinante (Promega, E1702) est diluée dans du PBS à la concentration de 1 μ g/ml, puis déposée à raison de 100 μ l par puits dans une plaque 96 puits et laissée une nuit à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés plusieurs fois dans du PBS-tween20 (0,1%) afin d'éliminer la protéine non adsorbée, la saturation des sites aspécifiques est ensuite effectuée avec une solution PBS-tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%) mise en incubation 30 minutes à température ambiante. Les puits sont à nouveau lavés plusieurs fois dans du PBS-tween20 (0,1%) puis les sérums de souris prélevés sont déposés sur la plaque en triplicate dilués au 1000^e dans du PBS-tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%). L'incubation est effectuée à 37°C pendant deux heures. Les

puits sont à nouveau lavés plusieurs fois dans du PBS-tween20 (0,1%) puis mis en incubation une heure avec les anti-immunoglobulines de souris couplées à la peroxydase (Amersham pharmacia biotech NXA931) diluées au 2000^e dans une solution de PBS-tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%). Les puits sont lavés à nouveau, la révélation est obtenue ensuite en déposant une solution d'Orthophénylènediamine (1mg/ml) dans du tampon citrate avec 20 μ l de H₂O₂ pour 10ml de solution. Au bout de quelques minutes les puits se colorent. La réaction est arrêtée par ajout de 50 μ l par puits de HCl 3N. L'absorbance est mesurée à 492nm dans un lecteur de plaque.

Dosage de l'érythropoïétine (EPO)

Pour doser l'érythropoïétine nous utilisons le kit développé par Medac (Enzyme immunoassay for the quantitative determination of EPO in serum, cat. n°500) : brièvement, l'érythropoïétine de souris va être détectée à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre 2 parties différentes de la protéine. Le premier anticorps est fixé au fond de chaque puits de la plaque de dosage et le deuxième anticorps est couplé à la phosphatase alcaline. L'activité de la phosphatase alcaline de l'anticorps fixé modifie le substrat p-nitrophenylphosphate en une solution p-nitrophenol jaune vif. L'extinction suit la loi de Beer-Lambert et est mesurée à 405nm. La quantité d'EPO des échantillons est déterminée grâce à une gamme étalon réalisée avec des quantités connues d'Epo recombinante. La fenêtre de détection se situe entre 1,25 et 160 mIU/ml. En pratique, pour chaque mesure, 25 μ l de l'échantillon et 25 μ l de tampon de dilution sont déposés dans un puits, au fond duquel est fixé le premier anticorps reconnaissant l'Epo de souris. Les plaques sont mises en incubation pendant 1 heure à 37°C. Les puits sont alors vidés et rincés 3 fois avec 300 μ l de tampon de lavage. Après avoir séché les plaques, 50 μ l de la solution du deuxième anticorps couplé à la phosphatase alcaline sont déposés dans chaque puits. Après une incubation à température ambiante pendant une heure et une fois les puits vidés, une seconde série de 4 lavages est effectuée. 50 μ l de la solution de substrat sont ajoutés et mis en incubation 30 minutes à température ambiante dans une chambre humide. La réaction est stoppée en ajoutant 50 μ l d'une solution d'hydroxyde de sodium. Au cours de l'incubation à température ambiante et dans le noir, une coloration jaune apparaît. La densité optique de la solution contenue dans les puits est alors mesurée à 405nm. A chaque valeur obtenue est retranchée la valeur moyenne des zéros chromogéniques. En fonction des résultats obtenus avec la gamme, une courbe étalon de la densité optique à 405nm en fonction de la concentration en EPO peut être tracée. Ainsi, la concentration des échantillons est calculée à l'aide de cette courbe étalon.

Dosage de la protéine FcBoNT

Biotinylation des anticorps Une solution d'hydrosuccinimide de biotine (Roche) est préparée à 10mg/ml dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde). L'anticorps est préparé à une concentration de 1mg/ml dans du tampon borate de sodium 0,1M pH 8,8. L'anticorps est ensuite ajouté à l'hydrosuccinimide de biotine à un ratio de 250 μ g d'hydrosuccinimide de biotine par mg d'anticorps 4 heures à température ambiante. On ajoute ensuite 20 μ l de NH₄Cl 1M pour 250 μ g d'hydrosuccinimide de biotine. Après une dialyse d'une nuit dans du PBS pour éliminer l'hydrosuccinimide de biotine non fixé (cassette de dialyse, Pierce, cut-off de 10 000MW), l'anticorps biotinylé est récupéré et conservé à 4°C.

Vérification de la biotinylation La biotinylation de l'anticorps est vérifiée par ELISA. La protéine FcBoNT est diluée dans du tampon carbonate à la concentration de 1 μ g/ml, puis déposée à raison de 100 μ l par puits dans une plaque NUNC immuno et laissée une nuit à température

ambiante. Les puits sont lavés trois fois dans du PBS-tween20 (0,1%) afin d'éliminer la protéine non adsorbée, la saturation des sites aspécifiques est ensuite effectuée avec une solution PBS-tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%) mise en incubation 30 minutes à température ambiante. Les puits sont à nouveau lavés plusieurs fois dans du PBS-tween20 (0,1%). L'anticorps biotinylé est ensuite déposé en dilution croissante dans du PBS-tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%) à raison de 100 μ l par puits. Après une incubation d'une heure à 37°C, les puits sont lavés trois fois puis mis en incubation avec de la streptavidine couplée à la peroxydase (Extravidin, SIGMA) diluée au 1/400^e dans du PBS. La révélation est obtenue ensuite en déposant une solution d'Orthophénylènediamine (1mg/ml) dans du tampon citrate avec 20 μ l de H₂O₂ pour 10ml de solution. Au bout de quelques minutes les puits se colorent. La réaction est arrêtée par ajout de 50 μ l par puits de HCl 3N. L'absorbance est mesurée à 492nm dans un lecteur de plaque.

Tyramide System Amplification (TSA) Le composé Biotine-Tyramide est préparé en mélangeant l'hydrosuccinimide de biotine avec la tyramine. Pour 1 mole d'hydrosuccinimide de biotine il faut 0,9 mole de tyramine et 1,13 mole de TEA (triéthylamine). Les composés hydrosuccinimide de biotine et tyramine sont dilués dans du DMF (diméthylformamide). Le mélange est mis en incubation une nuit à l'abri de la lumière sous agitation lente.

Lorsque de la streptavidine couplée à la peroxydase est utilisée, que ce soit pour un Western-Blot ou pour un dosage ELISA, le système TSA peut être utilisé pour une amplification du signal. Après une incubation de 30 minutes avec la streptavidine couplée à la peroxydase (Extravidin) diluée au 1/400^e dans du PBS, on effectue deux lavages avec du PBS puis un lavage dans le tampon d'amplification (tampon borate 0,1M pH 8,5 (6,18g d'acide borique dans 1 litre d'eau milliQ, pH ajusté à 8,5 avec du NaOH) + 0,003% d'H₂O₂). Le composé Biotine-Tyramide est dilué au 1/50 000^e dans le tampon d'amplification et mis en incubation 30 minutes. Après trois lavages en PBS, une nouvelle incubation est réalisée avec la streptavidine couplée à la peroxydase à une dilution 1/400^e dans du PBS 30 minutes à température ambiante. Trois lavages sont ensuite effectués en PBS puis la révélation est obtenue avec le substrat de la peroxydase.

Dosage de la protéine L'anticorps anti-FcBoNT (polyclonal de lapin, fourni par l'Unité Bactérie Anaérobie et Toxine, Dr. M. Popoff, Pasteur) est dilué dans du PBS à la concentration de 1 μ g/ml, puis déposé à raison de 100 μ l par puits dans une plaque NUNC immuno et laissé une nuit à température ambiante. Les puits sont lavés trois fois dans du PBS-tween20 (0,1%) afin d'éliminer la protéine non adsorbée, la saturation des sites aspécifiques est ensuite effectuée avec une solution PBS-tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%) mise en incubation 30 minutes à température ambiante. Les puits sont à nouveau lavés plusieurs fois dans du PBS-tween20 (0,1%) puis les surnageants de culture ou les sérums de souris prélevés dilués dans du PBS-tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%) sont déposés sur la plaque. L'incubation est effectuée à 37°C pendant deux heures. Les puits sont à nouveau lavés plusieurs fois dans du PBS-tween20 (0,1%) puis mise en incubation une heure avec l'anticorps anti-FcBoNT biotinylé dilué dans une solution de PBS-tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%). Les puits sont lavés à nouveau, puis mise en incubation 30 minutes avec de la streptavidine couplée à la peroxydase diluée au 400^e dans du PBS. Après une étape d'amplification avec le TSA, la révélation est obtenue en déposant une solution d'Orthophénylènediamine (1mg/ml) dans du tampon citrate avec 20 μ l de H₂O₂ pour 10ml de solution. Au bout de quelques minutes les puits se colorent. La réaction est arrêtée par ajout de 50 μ l par puits de HCl 3N. L'absorbance est mesurée à 492nm dans un lecteur de plaque.

5.3 Immunofluorescence

Les cellules sont ensemencées en plaque 12 puits contenant des lamelles de verre au fond des puits. 24 heures après la transfection, les cellules sont lavées avec du PBS. Puis les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% (p/v, PFA en PBS) 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées à nouveau avec une solution PBS/BSA 0,2%/saponine 0,05% : la BSA est utilisée pour la saturation des sites aspécifiques, et la saponine pour la perméabilisation des cellules. Cette solution est laissée 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite mises en incubation deux heures avec l'anticorps primaire AcI dilué dans du PBS/BSA 0,2%/saponine 0,05%. On effectue ensuite trois lavages avec la même solution puis les cellules sont mises en incubation une heure avec l'anticorps secondaire AcII, couplé à un fluorochrome et dilué dans du PBS/BSA 0,2%/saponine 0,05%. Après trois lavages avec une solution PBS/BSA 0,2%/saponine 0,05%, les noyaux des cellules sont colorés 30 minutes avec du DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindone), qui est un intercalant de l'ADN de couleur bleue en fluorescence (excitation 372nm, émission 456nm). Ceci nous permettra d'identifier les cellules. Après un dernier lavage avec du PBS puis de l'eau, les lamelles sont montées sur des lames avec du Mowiol.

Cible	Anticorps primaire	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
Luc	anti-luciférase (<i>SIGMA, L2164, 2mg/ml</i>)	1/200	anti-IgG de souris-AMCA (<i>Vector AbCys, CI-2000, 1,5mg/ml</i>)	1/100
FcBoNTA	anti-FcBoNTA (<i>TB5, fourni par Hervé Volland, CEA, 2,16mg/ml</i>)	1/200	anti-IgG de souris-FITC (<i>SIGMA, F2653</i>)	1/400
FcBoNTA	anti-FcBoNTA biotinylé (<i>TB5 biotinylé au laboratoire, 0,1mg/ml</i>)	1/10	streptavidine-Rhodamine (<i>1,7mg/ml</i>)	1/400
Golgi	anti-GM130 (<i>BD Bioscience, 610822, 250µg/ml</i>)	1/250	anti-IgG de souris-FITC	1/400

TAB. 8 – *Anticorps utilisés pour l'immunofluorescence.*

Microscope à fluorescence

Les lames sont observées avec un microscope à fluorescence Axiphot (Zeiss) couplé à une caméra CCD refroidie (Hamamatsu) et un logiciel d'images Samba (Unilog, Meylan, France).

Microscope confocal

Les lames sont observées avec un microscope confocal TCS SP2 (Leica).

5.4 Western-Blot

Préparation du lysat cellulaire

Le culot de cellules est remis en suspension dans 2,5 fois son volume avec un tampon de lyse 1X (SDS (2,5%) TRIS (50mM); pH 7,5). Après une étape de congélation/décongélation (-20°C/37°C), l'ADN est éliminé en retirant au cure-dent la masse visqueuse. Après une centrifugation de 15 minutes à 10000g le surnageant est récupéré pour être déposé.

Préparation des échantillons et migration sur gel

Le système utilisé pour l'électrophorèse est le NuPAGE Bis-Tris Electrophoresis System (cuve : XcellTM Minicell SureLock, Invitrogen ; générateur : Branson 1210 Bio-rad model 200/2.0 power supply). Le choix du tampon de migration et du gel dépend de la taille de la protéine analysée. Le tampon dans lequel sont préparés les échantillons contient du SDS. C'est un détergent qui dénature et charge négativement les protéines qui migreront donc vers le pôle positif. Les échantillons sont tous ajustés à la même concentration en protéines après dosage BCA. L'échantillon à analyser est dilué en présence d'un tampon de charge 1X (NuPAGE LDS Sample Buffer), d'un agent réducteur 1X (NuPAGE Sample Reducing Agent) et d'eau, puis chauffé 10 minutes à 80°C. Le tampon de migration utilisé est du MOPS SDS Running Buffer 1X (MOPS 1M (3-(N-morpholino) propane sulfonic acid) ; Tris Base 1M ; SDS 69,3mM ; EDTA 20,5mM ; complété à 500ml avec de l'eau ultra pure). Les dépôts se font sur gel d'Acrylamide/Bis-Acrylamide (NuPAGE BIS-TRIS gel 4-12%). La migration s'effectue pendant une heure environ à 200V.

Coloration au bleu de Coomassie

En milieu acide, le bleu de Coomassie s'adsorbe sur les protéines. La présence d'acide acétique dans la solution de coloration permet la fixation des protéines dans le gel. Ceci permet d'éviter le phénomène de diffusion des protéines dans le gel. La révélation du gel s'effectue en deux étapes : une étape de coloration au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie, brilliant blue R-250 (0,25%) ; méthanol (5 volumes) ; acide acétique (1 volume) ; H₂O (5 volumes)) pendant 30 minutes environ, puis une étape de décoloration avec un mélange éthanol (3%, v/v) ; acide acétique (0,8%) ; H₂O pendant 1 à 2 heures.

Western blot

Après une électrophorèse sur gel d'Acrylamide/Bis-Acrylamide les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-rad trans-blot R transfer medium). Les protéines du gel étant chargées négativement il faut, pour ce transfert, appliquer un champ électrique avec l'anode placée du côté de la membrane. Le gel et la membrane sont montés sur le système, le tout baignant dans le tampon de transfert. Un champ électrique de 25V est appliqué pendant 1 heure. La membrane est ensuite saturée avec une solution de PBS-Tween(0,05%)BSA(0,3%) (p/v) une heure sous agitation à température ambiante. Ceci nous permet d'éviter la fixation des anticorps sur des sites non spécifiques. La membrane est ensuite mise en incubation avec l'anticorps primaire (*AcI : anti-FcBoNTA polyclonal fait chez le lapin, Institut Pasteur, dilution 1/1000 dans PBS Tween BSA*) pendant une heure. On effectue ensuite un lavage rapide puis deux lavages de 30 minutes au PBS Tween BSA afin d'éliminer les anticorps qui ne se sont pas fixés. On ajoute ensuite l'anticorps secondaire (*AcII : anti-IgG de lapin biotinylé, Vector AbCys, BA-1000, dilution 1/2000 dans PBS Tween BSA*) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. On effectue de nouveau un lavage rapide et deux lavages de 30 minutes puis la membrane est mise en incubation 30 minutes avec de la streptavidine couplée à la peroxydase (*Extravidin, Sigma, E2886, dilution 1/400 dans PBS*). La membrane est enfin lavée quatre fois au PBS puis à l'eau. La révélation est obtenue avec le substrat de l'enzyme, le 3.3' Diaminobenzidine (DAB) qui donne un produit coloré. Lorsque la coloration est suffisante la membrane est rincée à l'eau distillée puis à l'EDTA 500mM puis de nouveau à l'eau.

6 Expérimentation animale

6.1 Animaux

Toutes les expériences sur animaux ont été réalisées d'après les recommandations pour l'expérimentation animale du NIH et du comité national d'éthique.

Les souris utilisées sont :

- des souris femelles C57Bl/6 (IFFA Credo, Charles River ou Janvier)
- des souris femelles ou mâles CD-1 (Swiss) (IFFA Credo, Charles River ou Janvier)
- des souris femelles SCID (IFFA Credo)

Les lapins utilisées sont des lapins mâles Neo-Zelandais (Charles River).

6.2 Anesthésie

Les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale de $10\mu\text{l/g}$ d'un mélange anesthésiant de kétamine (8,6g/l; Clorkétam 1000, Vétoquinol) et de xylazine (0,26g/l; Rompun[®] 2%, Bayer) en solution dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%). Ceci correspond à une solution de 86mg/kg de kétamine et 2,6mg/kg de xylazine.

Les lapins sont anesthésiés par injection intramusculaire de 1ml/kg d'un mélange anesthésiant de 35mg/kg de kétamine (Clorkétam 1000, Vétoquinol) et de 5mg/kg de xylazine (Rompun[®] 2%, Bayer) en solution dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%).

6.3 Transfert de gènes *in vivo* dans le muscle squelettique de souris

Rasage :

Après l'anesthésie, les pattes postérieures des souris sont rasées à l'aide d'une tondeuse (Cordless small animal clipper, Harvard Apparatus).

Prétraitement à la hyaluronidase :

Lorsque nécessaire, nous avons injecté dans le muscle tibial cranial de la souris anesthésiée, $25\mu\text{l}$ d'une solution à $0,4\text{U}/\mu\text{l}$ de hyaluronidase (Sigma H-3631) dans du NaCl 0,9% deux heures avant l'injection d'ADN et électrotransfert.

Injection de plasmides :

Une solution d'ADN (dilué dans un volume final de $30\mu\text{l}$ par patte dans du sérum physiologique, NaCl 0,9%) est injectée dans le muscle tibial cranial à l'aide d'une seringue Hamilton ou d'une seringue à insuline.

Electrotransfert :

Après l'injection d'ADN, le muscle à transférer est enduit d'un gel conducteur (Sigma Electrode Cream, Parker Laboratories). Les impulsions électriques d'onde carrée sont générées à l'aide d'un électropulsateur de type Genetronix T820 (BTX Genetronics, USA) et appliquées au muscle à l'aide de deux électrodes plates en acier inoxydable, distantes de quelques millimètres et placées de part et d'autre de la patte de la souris. Les conditions standard d'électrotransfert mises au point au laboratoire sont : 8 impulsions de 200V/cm, d'une durée de 20 ms chacune et administrées à la fréquence de 2 Hertz [76].

6.4 Transfert de gènes *in vivo* en intradermique chez la souris

Rasage :

Après l'anesthésie, le dos des souris est rasé à l'aide d'une tondeuse (Cordless small animal clipper, Harvard Apparatus).

Injection de plasmides :

Une solution d'ADN (dilué dans un volume final de 100 μ l par patte dans du sérum physiologique, NaCl 0,9%) est injectée en intradermique sur le dos des souris à l'aide d'une seringue à insuline.

Electrotransfert :

Après l'injection d'ADN, la peau est enduite d'un gel conducteur (Sigma Electrode Cream, Parker Laboratories) autour du site d'injection. Les impulsions électriques d'onde carrée sont générées à l'aide d'un électropulsateur de type Genetronix T820 (BTX Genetronics, USA) et appliquées sur la peau à l'aide de deux électrodes plates en acier inoxydable, distantes de quelques millimètres et placées de part et d'autre du volume formé par le liquide injecté en intradermique. Les conditions standard d'électrotransfert mises au point au laboratoire ont également été utilisées pour la peau : 8 impulsions de 200V/cm, d'une durée de 20 ms chacune et administrées à la fréquence de 2 Hertz.

6.5 Transfert de gènes *in vivo* dans le muscle chez le lapin

Rasage :

Après l'anesthésie, une zone de quelques cm² sur la patte arrière du lapin est rasée à l'aide d'une tondeuse (Cordless small animal clipper, Harvard Apparatus).

Injection de plasmides :

Une solution d'ADN (dilué dans un volume final de 300 μ l par patte dans du sérum physiologique, NaCl 0,9%) est injectée dans le muscle fémoral à 10mm de profondeur à l'aide d'une seringue à insuline .

Electrotransfert :

Après l'injection d'ADN, des impulsions électriques d'onde carrée sont générées à l'aide d'un électropulsateur de type Genetronix T820 (BTX Genetronics, USA) et appliquées au muscle à l'aide de trois électrodes aiguilles en acier inoxydable, distantes de 5mm chacune et placées de part et d'autre du site d'injection à 15mm de profondeur. Les conditions d'électrotransfert utilisées sur le lapin sont : 8 impulsions de 125V/cm, d'une durée de 20 ms chacune et administrées à la fréquence de 2 Hertz [76].

6.6 Prélèvements

Prélèvements des muscles chez la souris

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Le muscle tibial cranial est mis à nu puis prélevé. Pour le dosage de protéines, d'ADN ou d'ARN, les muscles sont directement congelés

dans des tubes à sec dans de la carboglace puis conservés à -80°C . Pour la réalisation de coupes histochimiques, les muscles sont fixées avec de la gomme adragante sur un bouchon de liège et l'ensemble est plongé pendant une minute dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide. L'ensemble bouchon+muscle est conservé à -80°C .

Prélèvements de sang

Les échantillons de sang sont prélevés chez la souris par ponction rétro-orbitale à l'aide d'une pipette pasteur. Après coagulation du sang à 4°C , les échantillons sont centrifugés à 4°C pendant 20 minutes à 2000g puis les sérums prélevés et conservés à -80°C jusqu'au dosage.

Chez le lapin, les échantillons de sang sont prélevés dans l'artère de l'oreille. Après coagulation du sang à 4°C , les échantillons sont centrifugés à 4°C pendant 20 minutes à 2000g puis les sérums prélevés et conservés à -80°C jusqu'au dosage.

Mesure de l'hématocrite

Le sang est soit prélevé directement dans un microcapillaire hépariné soit l'extrémité du microcapillaire est placée dans le tube du prélèvement sanguin : le sang pénètre dans le tube par capillarité. L'extrémité du microcapillaire est bouchée avec de la cire molle sur environ 2mm. Les microcapillaires sont ensuite centrifugés pendant 5 minutes à 8000 trs/min dans une microcentrifugeuse (Sigma 1-15). L'hématocrite est calculé en faisant le rapport de la hauteur des globules rouges sur la hauteur totale de sang, en multipliant la valeur par 100 pour obtenir un pourcentage [277].

6.7 Histologie

Les analyses histologiques ont été réalisées par le Dr. J.M. Caillaud de la société Biodoxis. Les muscles prélevés 15 jours et 30 jours après électrotransfert sont fixés dans une solution PBS/formol 4% pendant 3 jours à 4°C . Ils sont ensuite inclus dans un bloc de paraffine avant d'être découpés en tranches. Les lames sont colorées avec un mélange hématoéosine-safran.

Les coupes de muscles pour l'analyse de la fluorescence ont été effectuées à l'aide d'un cryostat. Les coupes sont déposées sur des lames de verre et après hydratation, les lames sont fixées avec du Mowiol.

6.8 Test de neutralisation

Ce test de neutralisation est réalisé dans l'Unité Bactéries anaérobies et Toxines de l'Institut Pasteur dirigée par le Dr. M. Popoff. La présence d'anticorps neutralisants est déterminée par un test de létalité chez la souris : la neurotoxine botulique de type A est produite et calibrée à 10 Doses Létale Souris par ml. Des dilutions de sérum sont ensuite mises en incubation avec 2 ml de préparation de toxine 30 minutes à 37°C , et injectées à des souris par voie intrapéritonéale (2 souris par dilution, 1ml par souris). Les souris sont ensuite observées pendant quatre jours. Les résultats sont exprimés en unités neutralisantes par ml (une unité neutralisante correspondant au volume de sérum neutralisant 10 Doses Létales Souris).

7 Imagerie du petit animal

7.1 Préparation de l'animal

La souris est anesthésiée et la zone d'intérêt est rasée à l'aide d'une tondeuse ou de crème épilatoire. La souris est ensuite fixée sur un support noir à l'aide de ruban adhésif.

7.2 Caméra CCD

L'imagerie optique est réalisée avec une caméra CCD refroidie (Apogee, Ap47p) placée dans une boîte noire, fixée sur un support permettant de régler la hauteur et équipée d'un objectif macro 60mm. La caméra est connectée à un ordinateur : l'acquisition des images est pilotée par le logiciel MaxImDL. Pour le traitement et l'analyse des images, on utilise le logiciel BetaVision+ (Biospace).

Pour les mesures de luminescence

La température de la caméra est réglée sur -25°C . Les temps d'acquisition varient de 30 secondes à 4 minutes et l'objectif de la caméra est ouvert à F 2,8. La mesure est débutée entre 2 et 5 minutes après l'injection du substrat. Le substrat utilisé est la luciférine (Promega) utilisé en injection intrapéritonéale (2,5mg dans $250\mu\text{l}$ de PBS) ou en injection locale (de 100 à $400\mu\text{g}$ dans $40\mu\text{l}$ de PBS).

Pour les mesures de fluorescence

L'acquisition des données est réalisée généralement sur 0,1 seconde et l'objectif est ouvert à F 5,6. La lumière d'excitation est obtenue grâce à deux rampes d'illumination, à une longueur d'onde de $470\text{nm}\pm 20\text{nm}$ pour la GFP et $540\pm 20\text{nm}$ pour la DsRed. La lumière émise en dessous de 515nm pour la GFP et en dessous de 590nm pour la DsRed est éliminée par des filtres d'émission passe-haut placés au dessus de la source fluorescente.

8 Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel StatView en utilisant le test de Fisher (ANOVA, test a posteriori). Notations des statistiques : différence significative avec NS non significatif, * $p<0,1$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

Résultats

1

Suivi du transfert de gène par imagerie optique

Sommaire

1.1	Introduction	79
1.2	Contexte	79
1.3	Système de détection	80
1.4	Signaux optiques	81
1.5	Exemples d'application	84
1.6	Première mise au point : effet de la hyaluronidase	85
1.7	Deuxième mise au point : électrotransfert intradermique	87
1.8	Conclusion et perspectives	91

1.1 Introduction

Au cours de l'ensemble de ce travail, certaines mises au point de protocole ont été effectuées pour optimiser le transfert de gène. Ces études préliminaires ont généralement été effectuées sur des gènes rapporteurs en utilisant l'imagerie optique. Ce chapitre a donc pour objectif de présenter les résultats de ces différentes mises au point et par là même de décrire de façon succincte l'utilisation de l'imagerie optique pour le suivi du transfert de gène.

1.2 Contexte

Les techniques de transfert de gène nécessitent encore d'être optimisées du point de vue de l'efficacité, de l'expression à long terme et de la diversité des tissus cibles. Pour l'électrotransfert par exemple, les organes cibles principaux sont le muscle squelettique, la tumeur et la peau mais le champ d'application de cette technique est en pleine expansion avec son utilisation récente sur d'autres organes tels que la cornée [132,133], le foie [118], le poumon [119], le cerveau [125–128] (pour plus d'exemples, voir le tableau 4 dans l'introduction). La plupart de ces études se concentrent dans un premier temps sur la mise au point de la technique sur chacun de ces tissus en transférant un gène rapporteur. Il est indispensable de disposer de moyens simples et précis d'évaluation, pour tester la faisabilité, l'efficacité et le protocole optimal de ces nouvelles applications. Dans ce contexte, une évaluation du transfert de gène par une technique non invasive

trouve tout son intérêt. Ce type de méthode permet en effet le suivi simultané de la distribution et du niveau d'expression de la protéine d'intérêt à différents temps et avec un nombre restreint d'animaux, tout en permettant une analyse statistique plus fiable, chaque animal étant son propre contrôle. Parmi les méthodes non invasives d'évaluation du transfert de gène, l'imagerie optique présente l'avantage d'être simple d'utilisation (voir les revues détaillées de Honigman et al. [278], de Bogdanov et al. [279] et de Golzio et al. [280]) et de ne pas nécessiter une infrastructure lourde et coûteuse comme par exemple l'IRM ou la tomographie par émission de positons (PET).

1.3 Système de détection

Nous disposons au laboratoire d'une caméra CCD refroidie (température de travail de -25°C) fixée sur un support permettant de régler la hauteur et équipée d'un objectif macro 60mm. L'ensemble est placé dans une boîte noire permettant d'éviter la lumière parasite pour les mesures de luminescence (figure 1.1).

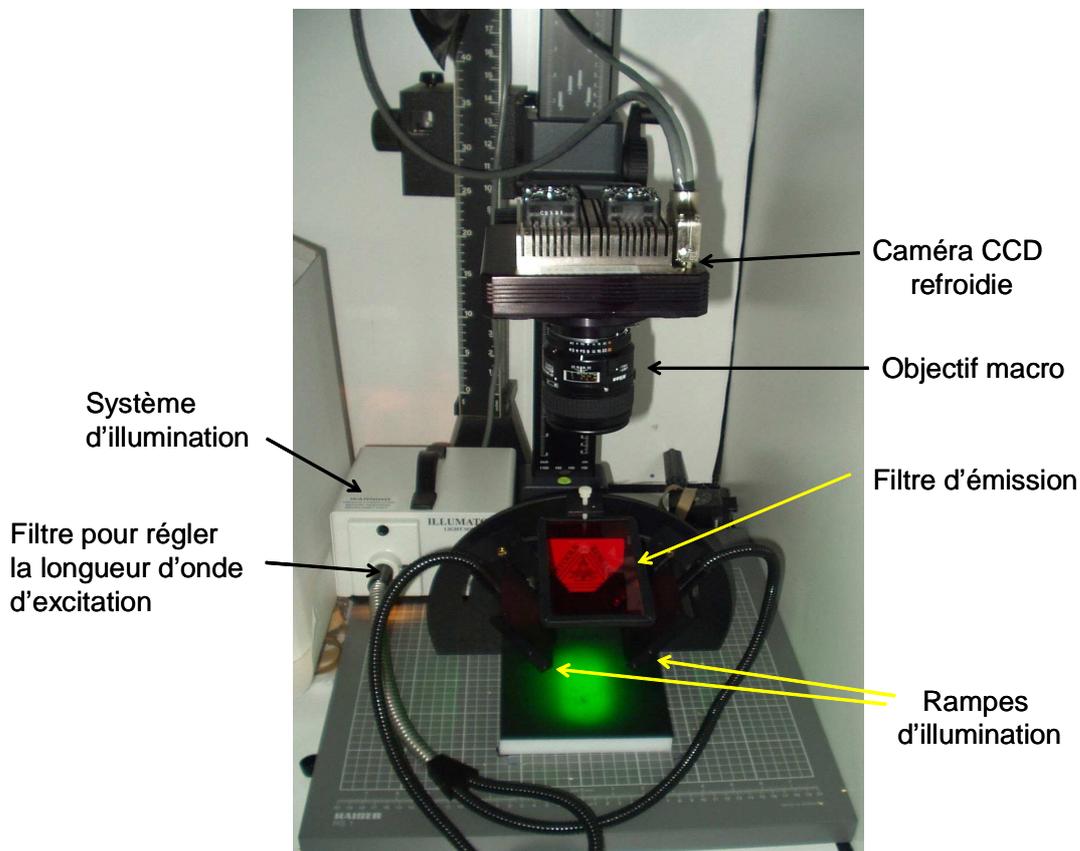


FIG. 1.1 – *Camera CCD refroidie utilisée pour l'imagerie.*

La lumière d'excitation filtrée est obtenue grâce à deux rampes d'illumination. La lumière émise est filtrée par des filtres d'émission passe-haut placés au-dessus de la source.

La caméra est connectée à un ordinateur : l'acquisition des images est pilotée par le logiciel MaxImDL. Pour le traitement et l'analyse des images, on utilise le logiciel BetaVision+ (Biospace). La quantification de la luminescence et de la fluorescence est réalisée sur des zones d'intérêt délimitées à l'écran par l'opérateur.

1.4 Signaux optiques

Pour suivre et quantifier l'expression d'un transgène en imagerie optique, différents outils peuvent être utilisés : la bioluminescence (émission de lumière) ou la fluorescence (absorption/émission de lumière). Pour cela différents gènes rapporteurs sont utilisés soit directement, soit fusionnés à un gène d'intérêt. Nous présentons ici ceux que nous avons utilisés dans le cadre de ce travail.

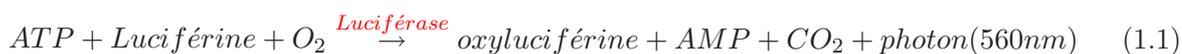
1.4.1 Bioluminescence

La bioluminescence est la production de lumière par un organisme, certaines entités sont en effet capables de restituer sous forme d'énergie $q=h\nu$ d'origine non thermique une partie de l'énergie échangée au cours d'une réaction de type chimique.

Le système le plus couramment utilisé est le système luciférase/luciférine. Au laboratoire nous utilisons le gène rapporteur codant la luciférase de luciole *Photinus pyralis* (firefly luciferase) : c'est une enzyme monomérique de 61 kDa qui ne requiert aucune modification post-traductionnelle. Elle est donc disponible en tant qu'enzyme fonctionnelle directement après la traduction de son ARN messager. Après sa synthèse, la luciférase est transportée du cytosol vers les peroxysomes grâce à un peptide signal, qui autorise la translocation de la protéine à travers la membrane peroxysomale [281]. Cependant dans notre cas nous avons travaillé avec deux plasmides similaires pC1-luc et pVaxLuc qui contiennent une version modifiée du gène luc initial, noté luc+, sur lequel entre autre le peptide signal a été supprimé pour une expression cytoplasmique.

Pour qu'il y ait production de luminescence, la luciférase doit réagir avec son substrat, la luciférine, qui appartient au groupe des benzothiazoles dans le cas de la luciférase de luciole.

La réaction chimique entre la luciférase et la luciférine, nécessite la présence d'ATP, d'ions Mg^{2+} et d'oxygène :



La luciférine peut être injectée *in vivo* en systémique (injection intrapéritonéale) ou en local directement dans le tissu cible, la quantité à injecter pouvant être, dans ce dernier cas, fortement réduite (article soumis).

Pour les mesures de luminescence, l'objectif de la caméra est ouvert au maximum à F 2,8. L'acquisition des données est réalisée pendant des temps variant de 30 secondes à 2 minutes environ.

1.4.2 Fluorescence

La GFP (Green Fluorescent Protein)

La GFP (green fluorescent protein) est une petite protéine de 27kDa obtenue à partir d'une méduse (*Aequorea victoria*), qui émet une fluorescence de couleur verte grâce à l'Aequorine, une protéine activée à partir de fluctuations du taux de calcium intracellulaire. L'Aequorine émet une lumière bleue (470nm), absorbée par la GFP qui elle-même réémet dans le vert à 509 nm. Aucune enzyme ni cofacteur, à l'exception de l'oxygène, ne sont nécessaire pour la fluorescence.

Nous avons travaillé avec le plasmide pEGFPC1 qui contient le gène d'un variant de la GFP optimisé pour une fluorescence plus intense et une expression plus élevée (maximum d'excitation à 488 nm ; maximum d'émission à 507 nm, figure 1.3).

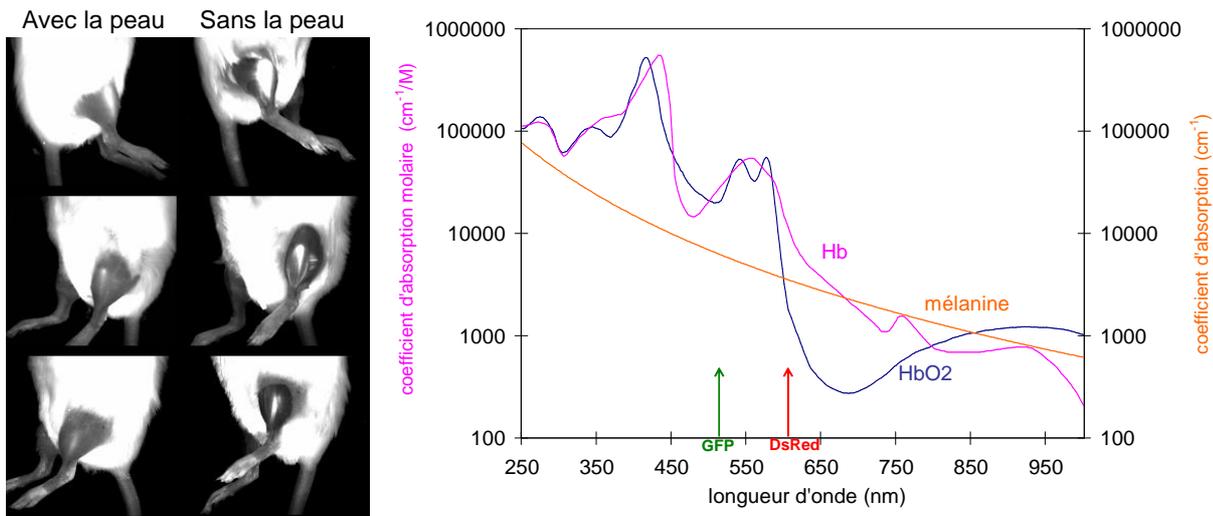


FIG. 1.2 – **Absorption par le tissu.** A. Absorption par la peau de la fluorescence de la GFP (la lumière émise est visualisée sur la même échelle de niveau de gris pour l'ensemble des photos) et B. Spectres d'absorption de l'hémoglobine (HbO₂), de la déoxyhémoglobine (Hb) et de la mélanine. Source : site <http://omlc.ogi.edu/spectra/index.html>

Pour les mesures de fluorescence de la GFP, l'objectif de la caméra est ouvert à F 5,6. La lumière d'excitation est filtrée à une longueur d'onde de $470\text{nm}\pm 20\text{nm}$ et la lumière émise est coupée en dessous de 515nm par un filtre d'émission passe-haut placé au dessus de la source fluorescente. L'acquisition des données est réalisée généralement sur 0,1 seconde.

Il faut préciser que pour certaines études qualitatives en fluorescence, nous avons utilisé simplement un appareil photo numérique plutôt que la caméra CCD.

Un des principaux inconvénients de la GFP est que la longueur d'onde de la lumière émise se situe au niveau de la zone de forte absorption par les tissus (principalement par l'hémoglobine et la mélanine, figure 1.2 B.). Pour illustrer ce point nous avons comparé la visualisation de muscles exprimant la GFP au travers de la peau ou en ayant retiré la peau du muscle (figure 1.2 A.).

La DsRed (Red fluorescent protein)

La DsRed (Red fluorescent protein) est une protéine qui présente 22% d'analogie avec la GFP. Elle a été clonée par Matz et al. en 1999, à partir d'un corail du genre *Discosoma* [282]. C'est une protéine tétramérique d'environ 120kDa. La DsRed a un maximum d'absorption à 558nm et un maximum d'excitation à 583nm , c'est-à-dire des propriétés spectrales fortement décalées vers le rouge.

Nous avons travaillé avec le plasmide pDsRed qui contient le gène DsRed-Express, un variant optimisé de la DsRed (maximum d'excitation = 558nm ; maximum d'émission = 583nm , figure 1.3).

Pour les mesures de fluorescence de la DsRed, l'objectif est ouvert à F 5,6. La lumière d'excitation est filtrée à $540\pm 20\text{nm}$ et la lumière émise est coupée en dessous de 590nm . L'acquisition des données est réalisée généralement sur 0,1 seconde.

Ces propriétés spectrales en font un outil efficace pour le suivi *in vivo* de l'expression d'un transgène au sein d'un tissu. En effet, si la mélanine et l'hémoglobine absorbent beaucoup la lumière émise aux faibles longueurs d'onde (comme celle émise par la GFP), elles absorbent

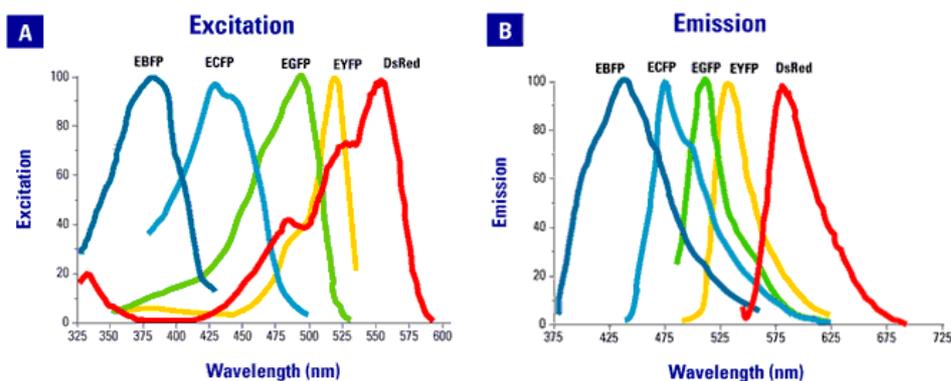


FIG. 1.3 – Spectres de différentes protéines fluorescentes dont la GFP et la DsRed.
Source : Clontech.

beaucoup moins celle émise à 600nm, comme c'est le cas de la DsRed (figure 1.2). D'autre part le filtre d'émission utilisé pour la DsRed (la lumière émise en dessous de 590nm est éliminée par un filtre d'émission passe-haut) permet d'éliminer le bruit de fond d'autofluorescence des tissus, qui fluorescent principalement dans le vert. On peut comparer à titre d'exemple l'autofluorescence des tissus observée sur deux photos prises sur des souris SWISS (poils blancs) après transfert du gène de la GFP ou de la DsRed (figure 1.4).

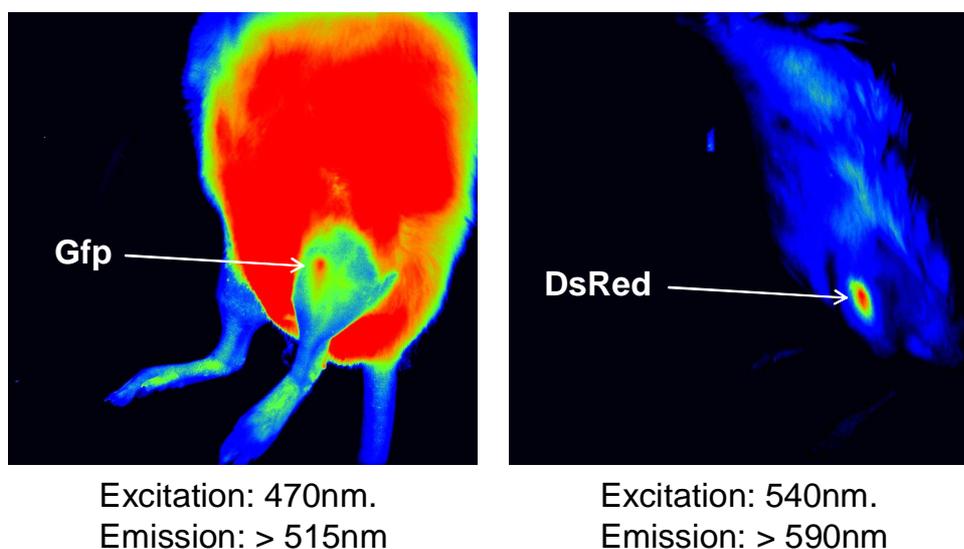


FIG. 1.4 – *Avantage de la DsRed par rapport à la GFP.* Le signal dû à l'autofluorescence est fortement diminué en utilisant le système optique de la DsRed.

1.4.3 Avantages et inconvénients

Ces signaux optiques présentent donc des avantages et des inconvénients qui sont représentés dans le tableau 1.1 suivant :

Pour combiner les avantages des deux techniques on peut fusionner deux gènes rapporteurs : c'est ce que nous avons fait en construisant le plasmide pEGFPC1-luc qui contient le gène de la

signal	intérêts	limitations
luminescence	forte sensibilité pas de source d'excitation externe détection non invasive	nécessité d'un substrat exogène faible résolution spatiale
fluorescence	marquage très stable détection non invasive bonne résolution spatiale pas de substrat exogène	nécessité d'une source d'excitation externe autofluorescence (de 350 à 500nm) facteurs environnementaux GFP : faible détection dans les tissus

TAB. 1.1 – *Avantages et inconvénients de différents signaux optiques.*

luciférase luc+ fusionné au gène de la GFP sous contrôle du promoteur CMV β .

1.5 Exemples d'application

1.5.1 Electrotransfert intramusculaire

Les conditions d'électrotransfert dans le muscle tibial cranial couramment utilisées au laboratoire (8 impulsions, 200V/cm, 20ms, 2Hz) conduisent à une expression élevée du transgène [76]. Nous avons validé par cette technique l'expression *in vivo* des différents plasmides utilisés en imagerie optique. Par exemple, après injection et électrotransfert de 40 μ g de plasmide pEGFPC1 dans une patte au niveau du muscle tibial cranial et 40 μ g de plasmide pDsRed dans l'autre patte d'une souris C57Bl/6, on observe une semaine après une forte expression des deux protéines (figure 1.5).



FIG. 1.5 – *Expression de la GFP et de la DsRed une semaine après injection et électrotransfert.* Photo prise avec un appareil photo numérique, avec une excitation à 470nm et un filtre d'émission passe haut (515nm), les conditions optimales pour la détection de la GFP

Cette image a été réalisée avec une source d'excitation et un filtre d'émission optimaux pour la GFP et non pour la DsRed, ces conditions permettant de visualiser simultanément les deux fluorescences (mais avec une expression qui semble qualitativement plus faible pour la DsRed). De plus, il faut noter que cette image n'a pas été réalisée avec la caméra CCD mais uniquement avec un appareil photo numérique pour avoir une image qualitative en couleur (la caméra CCD donne des images en niveaux de gris).

1.5.2 Suivi de l'expression de la GFP à long terme

L'imagerie optique permet de suivre l'expression d'un gène d'intérêt à long terme sur le même animal. Pour illustrer ce point nous avons réalisé un suivi de l'expression de la GFP pendant 169 jours après injection et électrotransfert de 50 μ g de plasmide dans le muscle tibial cranial sur une souris C57Bl/6. Brièvement, à différents temps après l'injection, la souris est anesthésiée, sa patte est rasée puis la souris est placée sous la caméra CCD avec une lumière d'excitation de 470nm. La lumière émise en dessous de 515 nm est éliminée par un filtre d'émission passe-haut placé au dessus de la source fluorescente. L'acquisition est réalisée pendant 0,1 seconde (figure 1.6). Les résultats de la cinétique sont présentés en fausses couleurs.

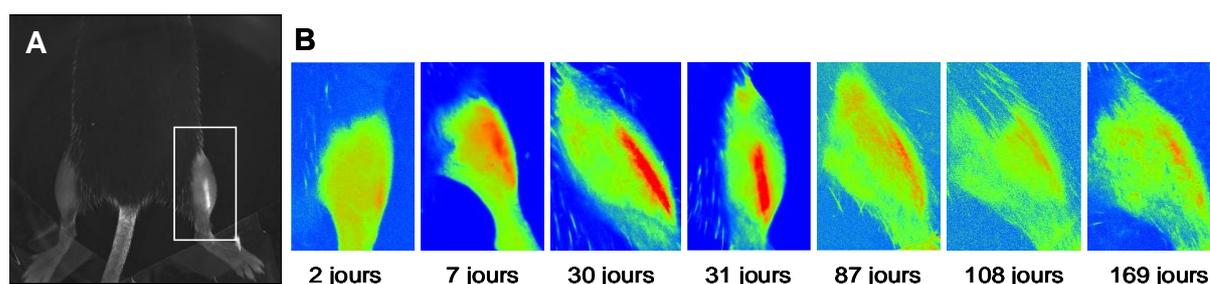


FIG. 1.6 – *Suivi de la cinétique d'expression de la GFP après injection et électrotransfert du plasmide pEGFP-C1. A. Photo de la souris avec la zone du muscle encadrée. B. Images en fausses couleurs du muscle transfecté au cours du temps (code de couleur : du bleu au rouge en fonction d'une intensité croissante).*

L'expression de la GFP est bien visible dans les fibres musculaires. Cette expression s'estompe progressivement au cours du temps mais est toujours détectable à 169 jours.

1.6 Première mise au point : effet de la hyaluronidase

1.6.1 Intérêt de la hyaluronidase

Le muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires, entourés de tissu conjonctif : lors d'un transfert de gène, l'ADN doit franchir de nombreuses barrières biologiques avant de parvenir au noyau des cellules cibles.

Les principales macromolécules constituant la matrice extracellulaire sont des polysaccharides (glycosaminoglycanes et protéoglycanes) et des protéines fibreuses de structure (collagènes et élastine) ou d'adhérence (fibronectine et laminine), jouant un rôle important dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice.

L'acide hyaluronique (figure 1.7) est un des principaux glycosaminoglycanes présents dans la matrice extracellulaire, il est caractérisé par une longue chaîne unique de plusieurs milliers de résidus sucrés, sans groupements sulfate. De nombreuses protéines extra-cellulaires de la matrice (collagène, fibronectine, laminine) ainsi que des récepteurs cellulaires de surface (comme le CD 44) peuvent se lier à l'acide hyaluronique.

La hyaluronidase est une enzyme responsable de la dégradation de l'acide hyaluronique : elle est impliquée dans sa dépolymérisation et son hydrolyse. Cette enzyme est utilisée pour augmenter le transfert de gène par des lipides cationiques dans le foie [283] ou dans des chondrocytes [284], elle est également utilisée pour améliorer le transfert de gène viral par des AAV [106]. Favre et al. ont en effet montré qu'un prétraitement à la hyaluronidase (100U/250 μ l, 3 heures

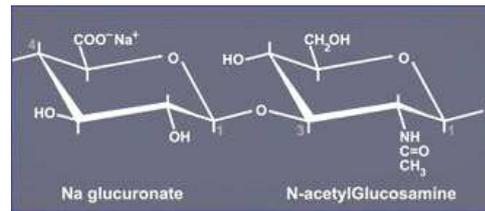


FIG. 1.7 – *Structure de l'acide hylauronique.*

avant) d'un muscle de rat permettait d'augmenter la diffusion d'un AAV dans le tissu conduisant une expression deux à trois fois plus élevée, sans toxicité apparente [106].

La hyaluronidase permet ainsi d'augmenter l'accessibilité du gène d'intérêt aux cellules cibles en détruisant partiellement la matrice extracellulaire : les zones transfectées sont plus étendues avec un niveau d'expression plus élevé. Cette enzyme a été utilisée récemment avec efficacité combinée à l'électrotransfert intramusculaire [105, 108, 172].

La mise au point d'un protocole optimal d'électrotransfert nécessite de trouver un équilibre entre un niveau d'expression élevé (lié au voltage nécessaire) et des dommages induits limités. Selon l'application souhaitée cet équilibre penchera plus vers l'un ou l'autre des paramètres. Par exemple, quand le but de l'électrotransfert est la production en systémique d'une protéine à long terme (mEpo, facteur IX) ou surtout l'induction d'une réaction immune (vaccination génétique), les dommages causés ne sont pas forcément gênants : un muscle sain récupère rapidement d'un dommage lié à l'électrotransfert par activation des cellules satellites et fusion de myoblastes pour régénérer les fibres musculaires. Par contre dans le cas du traitement de maladies telles que la dystrophie où les muscles sont fragiles, il est indispensable d'avoir une survie des fibres musculaires tout en optimisant le nombre de fibres transfectées [172].

La hyaluronidase permet donc dans certains cas de réduire le voltage utilisé, et ainsi de limiter le dommage musculaire, tout en garantissant un haut niveau d'expression. McMahon et al. ont montré lors d'un électrotransfert intramusculaire que l'injection de hyaluronidase n'induisait pas de dommage [108].

Dans notre cas nous souhaitons utiliser la hyaluronidase pour optimiser la capacité de production du muscle et la capacité de sécrétion de protéines (voir chapitre 3). Le but est, à voltage (et donc à dommage) égal de maximiser la production de protéines.

1.6.2 Mise en oeuvre

Nous avons voulu étudier par imagerie optique l'effet d'un prétraitement à la hyaluronidase sur l'expression d'un transgène après électrotransfert. Pour cela, nous injectons $25\mu\text{l}$ de hyaluronidase ($0,4\text{ U}/\mu\text{l}$) dans le muscle tibial cranial de 4 souris SWISS. Deux heures après ce prétraitement, $30\mu\text{g}$ de plasmide pEGFPC1-luc sont injectés et électrotransférés dans le muscle tibial cranial de ces mêmes souris. En parallèle, 4 autres souris SWISS reçoivent également $30\mu\text{g}$ de plasmide pEGFPC1-luc sans prétraitement. Une semaine après les souris sont anesthésiées et placées sous la caméra CCD. Des mesures de luminescence sont effectuées après injection en local dans le muscle de $100\mu\text{g}$ de luciférine dans $40\mu\text{l}$ de PBS. Deux heures après, les souris sont sacrifiées, les muscles sont récupérés et visualisés en fluorescence (figure 1.8).

Que ce soit en luminescence ou en fluorescence, on observe une expression beaucoup plus élevée lors d'un prétraitement à la hyaluronidase. Les images en fluorescence nous permettent de constater que la zone transfectée est plus étendue avec un plus grand nombre de fibres transfectées.

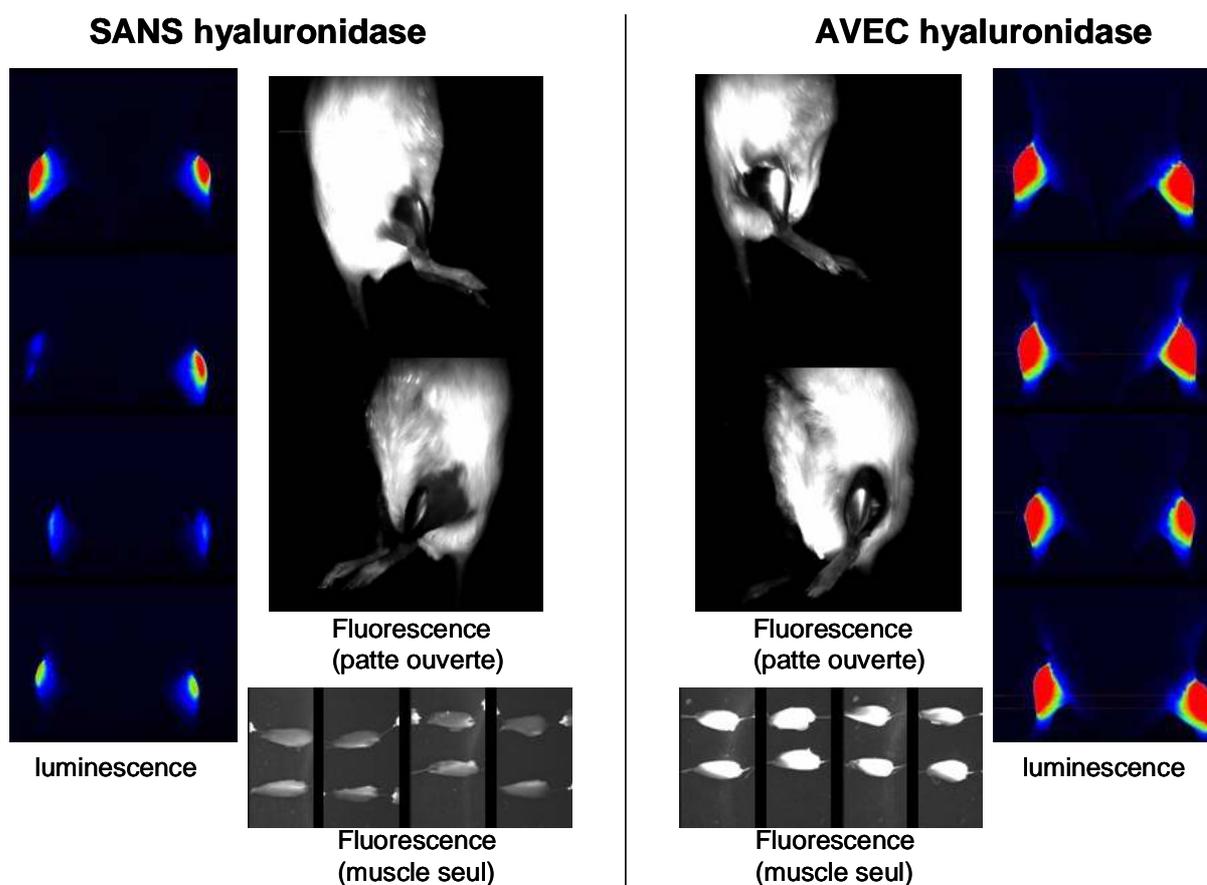


FIG. 1.8 – *Comparaison de l'expression après électrotransfert avec ou sans prétraitement à la hyaluronidase.* Les souris ont été injectées et électrotransférées avec 30 μ g de plasmide pEGFPC1-luc avec ou sans prétraitement à la hyaluronidase (25 μ l à 0,4 U/ μ l, 2 heures avant). Pour l'ensemble des images comparées, l'échelle de luminescence est la même.

1.7 Deuxième mise au point : électrotransfert intradermique

Dans le cadre de l'optimisation du transfert de gène pour une production d'anticorps à haut titre nous avons étudié l'électrotransfert en intradermique. L'électrotransfert dans la peau n'avait jamais été mis au point au laboratoire. Des essais préliminaires ont ainsi été réalisés avec deux gènes rapporteurs fluorescents.

1.7.1 La peau : cible de choix

La peau est un organe complexe couvrant toute la surface du corps en continuité avec les muqueuses. La peau a pour fonction principale la protection de l'organisme contre des agressions externes physiques, chimiques ou biologiques, grâce à sa structure élaborée associant des tissus de diverses origines (épithélial, conjonctif, vasculaire, musculaire) [149]. Elle permet de plus la transmission d'informations entre le corps et l'extérieur grâce à de nombreuses terminaisons nerveuses qui assurent la réception des stimuli tactiles, thermiques et douloureux. Elle intervient également dans la régulation de la température du corps et la synthèse de la vitamine D.

La peau est constituée de trois couches, de l'extérieur vers l'intérieur (de haut en bas sur le

schéma) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure 1.9).

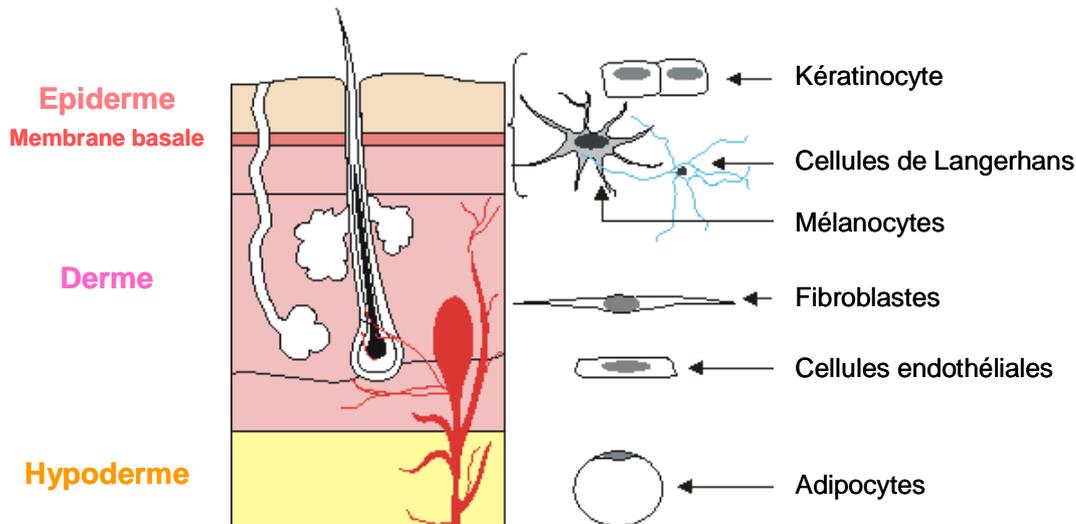


FIG. 1.9 – Coupe transversale de la peau.

L'épiderme est constitué de plusieurs types cellulaires : 90 à 95% de kératinocytes et 5 à 10% de mélanocytes (ces cellules assurent la protection naturelle contre les rayons solaires et sont responsables de la pigmentation de la peau), de cellules de Langerhans (cellules présentatrices d'antigène, APC), et de cellules de Merkel. L'épiderme est organisé en quatre couches de cellules, de la plus superficielle à la plus profonde : la couche cornée, la couche granuleuse, la couche muqueuse et la couche basale.

Le derme est un tissu conjonctif de soutien, d'épaisseur variable, lâche en périphérie et plus dense (fibreuse) en profondeur. Il contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs et des terminaisons nerveuses.

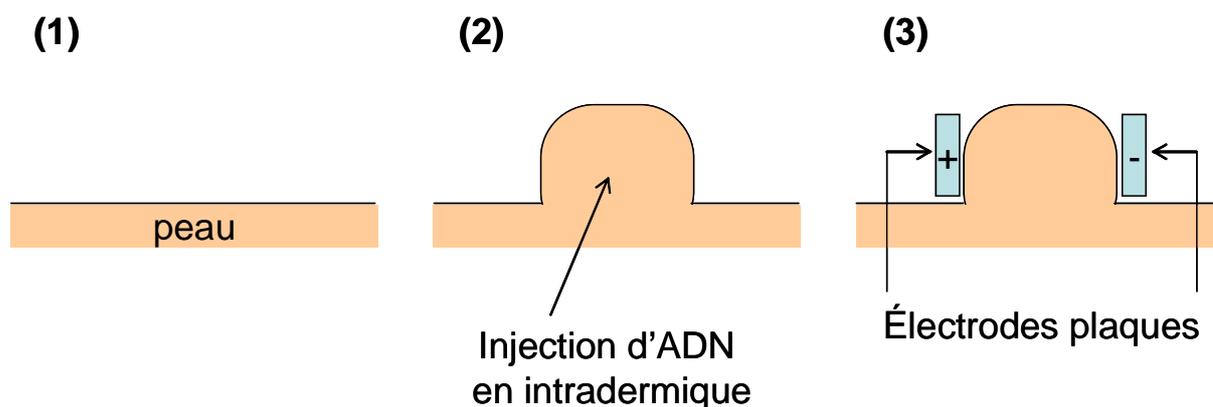
L'hypoderme, situé sous le derme, est un tissu conjonctif lâche contenant en fonction de sa localisation plus ou moins de tissu adipeux (cellules adipocytes). Il constitue un important réservoir énergétique pour l'organisme.

La peau représente la première ligne naturelle de défense du corps : elle est donc un organe de choix pour l'immunisation génétique. En effet, en transfectant les cellules de la peau, et plus particulièrement les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques situées dans l'épiderme et le derme, on peut parvenir à une réponse immunologique efficace [152].

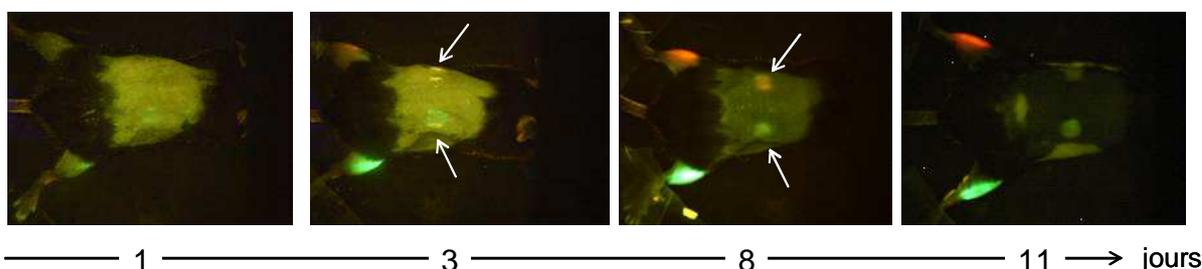
1.7.2 Mise en oeuvre

Un premier essai est effectué sur une souris C57Bl/6 selon le protocole de Zhang et al. [111] : après avoir rasé la peau de la souris au niveau du dos, 40 μ g de plasmide pEGFPC1 dans 25 μ l de NaCl 0,9% sont injectés en intradermique à l'aide d'une aiguille à insuline. Les électrodes plaques sont ensuite placées de part et d'autre de la peau au niveau de l'injection (épaisseur de 1mm environ) et 4 impulsions carrées unipolaires de 75V, d'une durée de 20ms et d'une fréquence de 2Hz sont appliquées. Ce protocole n'a pas donné de résultat satisfaisant : la zone de transfection observée était très faible en surface et en intensité.

Nous avons donc effectué un nouvel essai dans les conditions classiques d'électrotransfert que nous utilisons pour le muscle (8 impulsions, 200V/cm, 20ms, 2Hz), en injectant un volume plus important en intradermique (100 μ l). Ce protocole nous a été suggéré par le Dr. Muriel Golzio.

FIG. 1.10 – *Protocole d'électrotransfert en intradermique.*

Pour vérifier qu'il ne s'agissait pas d'un problème de sensibilité de la GFP nous avons traité une souris C57Bl/6 avec le plasmide pEGFPC1 et le plasmide pDsRed en deux sites d'injection distincts sur le dos. Brièvement nous avons injecté en intradermique à l'aide d'une aiguille à insuline 40 μ g de plasmide (pEGFPC1 ou pDsRed) dans 100 μ l de NaCl 0,9%. Les 100 μ l de solution injectés créent un grand volume au niveau de la peau (épaisseur 5mm environ) autour duquel sont appliquées les électrodes plaques (figure 1.10). Les conditions d'électrotransfert sont : 8 impulsions carrées unipolaires de 100V, d'une durée de 20ms, d'une fréquence de 2Hz. Pour vérifier l'efficacité de ce traitement en intradermique nous avons traité en parallèle les muscles de la même souris avec 40 μ g de chaque plasmide pEGFPC1 et pDsRed pour comparer les niveaux de transfection en intradermique et en intramusculaire.

FIG. 1.11 – *Suivi simultané de l'électrotransfert intradermique et intramusculaire sur une souris SWISS traitée avec les plasmides pEGFPC1 et pDsRed.*

Ce protocole semble efficace : on observe effectivement des zones de transfection sur le dos. En parallèle de ces photos numériques nous avons réalisé des acquisitions à l'aide de la caméra CCD. Les acquisitions sont réalisées pendant 0,1 seconde avec les couples source d'excitation/filtre d'émission adéquats pour la détection de la GFP d'une part et de la DsRed d'autre part. Les images sont ensuite traitées avec le logiciel BetaVision+ (Biospace). Nous avons en particulier quantifié la fluorescence de la DsRed sur des zones d'intérêt délimitées à l'écran par l'opérateur au niveau du muscle et de la peau.

On observe une expression élevée et durable dans le muscle, une expression plus faible mais néanmoins significative dans la peau qui diminue cependant assez rapidement au cours du temps. Cependant en travaillant sur des souris C57Bl/6, la mélanine empêche de visualiser réellement les

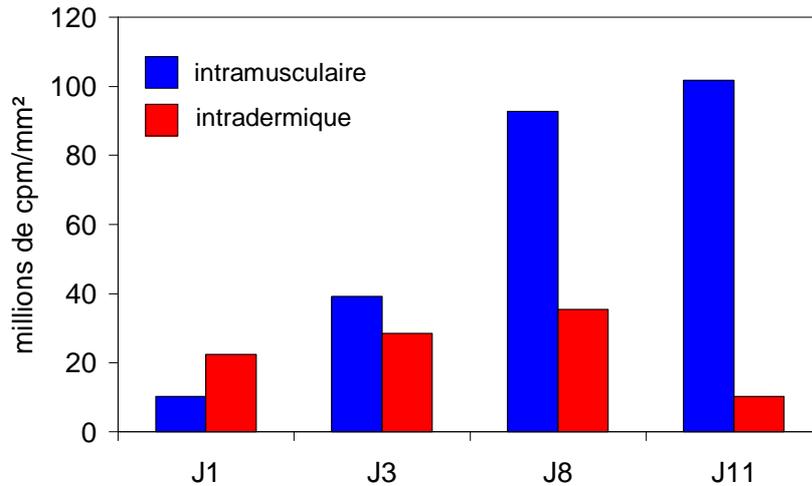


FIG. 1.12 – *Quantification de la fluorescence de la DsRed exprimée au niveau du muscle et de la peau après injection et électrotransfert en intramusculaire et en intradermique.*

zones transfectées (on peut observer sur les photos que la peau se recouvre d’une couche noire au cours du temps). Nous avons en particulier observé que la crème épilatoire favorise l’apparition de mélanine sur les zones épilées (voir photos figure 1.11).

Nous avons donc effectué une nouvelle cinétique d’expression de la DsRed sur trois souris SWISS blanches pour estimer plus précisément le temps d’expression d’un transgène après injection et électrotransfert en intradermique.

Nous avons injecté $40\mu\text{g}$ de plasmide pDsRed dans $100\mu\text{l}$ de NaCl en intradermique sur 3 souris SWISS. L’électrotransfert est ensuite réalisé comme précédemment (8 impulsions, $200\text{V}/\text{cm}$, 20ms , 2Hz). L’expression de la DsRed a été observée au cours du temps à l’aide du dispositif d’excitation/émission mais en prenant simplement des photos numériques (figure 1.13). Les souris apparaissent en rouge car les photos sont prises au-dessus du filtre d’émission de la DsRed (600nm).

On observe une zone fluorescente sur les trois souris avec un pic d’expression à 9 jours et une décroissance progressive. 20 jours après électrotransfert le signal n’est encore visible que pour une des trois souris. Pavselj et al. ont récemment montré un transfert de gène efficace dans la peau après injection en intradermique et électrotransfert, en utilisant la combinaison d’une impulsion à haut voltage perméabilisante (HV : $700\text{-}1000\text{V}/\text{cm}$; $100\mu\text{s}$) et d’une impulsion à faible voltage électrophorétique (LV : $140\text{-}200\text{V}/\text{cm}$; 400ms). Dans cette étude, l’expression de la luciférase est maintenue pendant 10 jours environ [112].

On peut observer également que la zone de fluorescence sur les souris n’est pas la même au cours du temps : la zone transfectée change de forme et semble se déplacer sur la peau. Nous n’avons pas d’explication pour ce phénomène. Il semble en effet peu probable que les cellules de la peau migrent aussi vite en si peu de temps. Il se peut que des cellules plus profondes aient été transfectées, et remontent à la surface au cours du temps. Cette expérience devra être reproduite pour analyser plus précisément ce phénomène, éventuellement en utilisant le gène de la luciférase pour doser l’expression *in vitro* sur différents échantillons de peau.

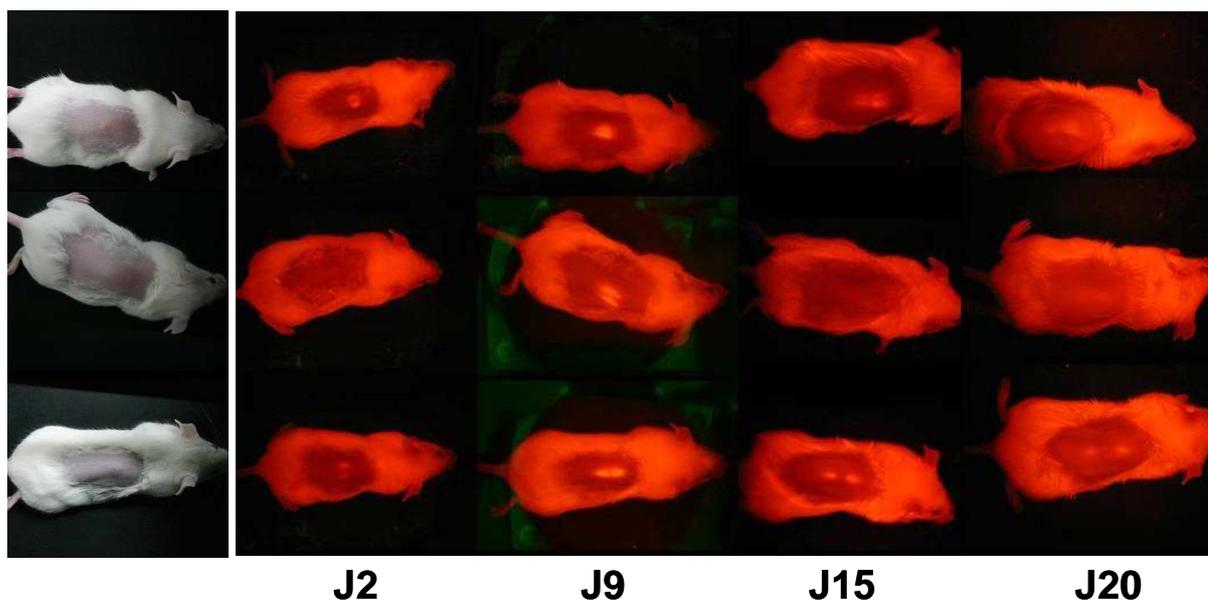


FIG. 1.13 – *Cinétique d'expression de la DsRed après injection et électrotransfert en intradermique.* Les souris ont été injectées et électrotransférées avec $40\mu\text{g}$ de plasmide *pDsRed*. Visualisation sous un filtre à 600nm de la fluorescence de la *DsRed* au cours du temps. Les photos ont été prises avec un appareil photo numérique.

1.8 Conclusion et perspectives

L'imagerie optique combinée à l'utilisation de gènes rapporteurs nous a permis de confirmer certains résultats sur l'électrotransfert et de mettre au point plusieurs protocoles. Ainsi :

- l'électrotransfert est une technique de transfert de gène efficace permettant de transférer une zone étendue, avec un niveau d'expression élevé et durable dans le muscle
- la hyaluronidase permet d'augmenter encore ce niveau d'expression dans le muscle
- l'injection et électrotransfert dans la peau permet une expression du transgène pendant environ deux semaines.

Au cours de ce travail, nous avons également pu évaluer de façon plus précise les avantages et les inconvénients de cet outil qu'est l'imagerie optique. En particulier nous avons pu apprécier l'intérêt de cet outil pour la validation du transfert de gène dans différents tissus.

Système de régulation de l'expression de gène par stratégie antisens

Sommaire

2.1	Introduction	93
2.2	Choix de la stratégie	94
2.3	Description du système de régulation	95
2.4	Constructions plasmidiques	96
2.5	Stratégie antisens	97
2.6	Système de régulation par un antisens conditionnel	103
2.7	Conclusions et Perspectives	122

2.1 Introduction

Dans le contexte du transfert de gène *in vivo*, il est très utile voire indispensable de disposer d'un système de régulation temporelle de l'expression de gène, que ce soit dans un but thérapeutique ou pour l'étude fonctionnelle de nouveaux gènes.

La maîtrise de l'expression génétique est une question très actuelle de la thérapie génique, qu'elle soit virale ou non virale. Dans la majorité des essais, le gène thérapeutique est sous contrôle d'un promoteur fort, de type CMV, provoquant une expression continue et non régulée du gène codant. Lors d'un transfert d'ADN de ce type, nous avons observé dans le muscle squelettique une expression relativement stable à long terme après une seule injection de plasmide. Cette expression continue peut s'avérer gênante, et du point de vue des cliniciens il sera absolument nécessaire de pouvoir contrôler le niveau et le moment de l'expression afin, notamment pour des raisons de sécurité, de pouvoir «arrêter» le traitement, par exemple en cas d'éventuels effets secondaires non désirables.

Par ailleurs, les avancées rapides du séquençage de nombreux génomes nécessitent de caractériser une multitude de nouvelles protéines. Une expression transitoire est souvent souhaitée à un moment précis du développement. Là encore un système de régulation efficace est nécessaire.

Le système de régulation idéal doit remplir de nombreux critères, en particulier un faible niveau basal associé à une induction élevée, une absence d'interférence avec les systèmes endogènes, une activation par un inducteur exogène non toxique de pharmacologie connue, un effet dépendant de la dose, un caractère réversible, et enfin une facilité d'usage (voir Introduction).

Le but de notre projet est de mettre au point un système combinant une stratégie antisens et le système de régulation Tet-Off développé par Gossen et Bujard [239] : la stratégie antisens permet d'inhiber l'expression d'un gène, le système Tet-Off permet de rendre cette inhibition régulable par la tétracycline.

2.2 Choix de la stratégie

2.2.1 Choix du système Tet-Off

De nombreux systèmes inductibles ont été mis au point pour réguler artificiellement un gène au niveau transcriptionnel. Parmi toutes les stratégies, les systèmes de régulation par la tétracycline sont les plus couramment utilisés car ils sont très efficaces et parce que la pharmacologie de la tétracycline (ou de son analogue, la doxycycline) est bien connue.

Le système initial Tet-Off développé par Gossen et Bujard permet une régulation efficace mais l'expression du gène est obtenue en absence de tétracycline (d'où son nom Tet-Off). Ce système nécessite donc l'administration continue de tétracycline et l'induction dépend de l'élimination de ce répresseur. Le système de régulation idéal pour la thérapie génique doit être un système «on» : l'expression du gène d'intérêt est obtenue uniquement lorsque l'on administre la molécule inductrice. Une version alternative Tet-On a donc été développée, basée sur une forme mutée du tTA transactivateur, nommée rtTA (reverse tTA) qui se lie à l'ADN en présence de l'inducteur. Dans le système Tet-on, l'addition de la molécule inductrice entraîne l'expression du transgène, alors que sa répression dépend de l'élimination de la molécule. La principale limitation du système Tet-On dans un contexte de thérapie génique est sa mauvaise cinétique d'induction et son fort niveau d'expression basal. Des modifications récentes ont été apportées au système incluant un nouveau transactivateur rtTA2^S-M2 qui permet un contrôle plus strict de l'expression d'un gène. Lors du choix de la stratégie de notre système de régulation, peu de données de la littérature existaient sur ce nouveau transactivateur. Une autre solution récemment mise au point pour diminuer le bruit de fond résiduel du système Tet-On est l'ajout d'un répresseur de transcription, ou «silencer» tTS (tetracycline transcriptional silencer) sous contrôle également de la tétracycline. Le tTS se lie sur le promoteur TetP en absence de tétracycline empêchant activement la transcription. En présence de tétracycline, le tTS est libéré et rtTA active la transcription en se liant au TetP. Cependant ce système nécessite l'ajout d'un composant de plus au système de régulation.

2.2.2 Choix d'une stratégie antisens

De nombreuses approches utilisant des acides nucléiques dans une stratégie antisens ont été mises au point pour éteindre l'expression de gènes spécifiques (pour une revue [225] et [285]). Parmi les acides nucléiques utilisés on peut citer les ARN ou oligonucléotides antisens, les ribozymes, les DNazymes, les ARN interférents. Ces stratégies permettent une inhibition spécifique de la traduction par formation de liaisons hydrogènes de type Watson-Crick entre la molécule antisens et l'ARNm cible.

Parmi ces approches, des vecteurs (viraux ou non viraux) exprimant des longs ARN antisens ont été utilisés, en particulier dans le domaine du cancer, permettant ainsi une expression intracellulaire à long terme de la molécule antisens.

Par exemple, Kang et al. ont montré que la transfection, médiée par un liposome, d'un plasmide portant l'ADNc en orientation antisens du VEGF conduit à une inhibition du développement tumoral chez des souris nudes greffées avec une lignée cellulaire humaine SK-HEP1 [286].

De la même façon, en transfectant de façon stable des cellules de cancer du sein MCF-7 par un vecteur hybride adénovirus/AAV transcrivant l'ARN antisens de la télomérase humaine, Zhang et al. ont montré que l'activité télomérase de ces cellules était effectivement inhibée, entraînant une diminution progressive des télomères au cours des multiples passages. De plus le phénotype tumoral des cellules a été sensiblement modifié avec une capacité de prolifération réduite ainsi qu'une sensibilité accrue à l'apoptose [287].

Il a également été montré au laboratoire que l'électrotransfert intratumoral d'un plasmide contenant le gène de la MBD2 (methylated DNA binding protein 2) en orientation antisens conduisait à une inhibition de la croissance tumorale dans un modèle de tumeur humaine greffée sur des souris nues [288].

L'expression conditionnelle d'un ARN antisens en utilisant le système inductible par la tétracycline a déjà été utilisé *in vitro* et *in vivo*. Par exemple le système Tet-Off a été utilisé pour obtenir une inhibition conditionnelle de l'expression d'IgM sécrétées par les lymphocytes B *in vitro* [289]. Un modèle de souris invalidée a également été développé, exprimant uniquement dans le coeur un ARN antisens contre le récepteur des minéralocorticoïdes pour étudier le rôle de ce récepteur dans le coeur [290]. Une approche similaire a été utilisée pour élucider la fonction de l'homéogène *pdx-1* (pancreatic and duodenal homeobox gene-1) dans des cellules pancréatiques en exprimant de façon conditionnelle un antisens contre *pdx-1* dans des souris transgéniques en utilisant le système Tet-On [291].

Toutes ces applications utilisant un ARN antisens, conditionnel ou non, ont pour but d'éteindre l'expression de gènes endogènes. Nous souhaitons donc étudier la possibilité qu'un ARN antisens régule l'expression d'un gène exogène *in vitro* et *in vivo* chez la souris.

2.3 Description du système de régulation

Le système de régulation à la tétracycline Tet-Off est basé sur la fusion du répresseur tetR de l'opéron du gène de résistance à la tétracycline d'*Escherichia coli*, *Tn10*, et d'une protéine du virus de l'herpès, VP16, qui possède un domaine d'activation de transcription (figure 2.1).

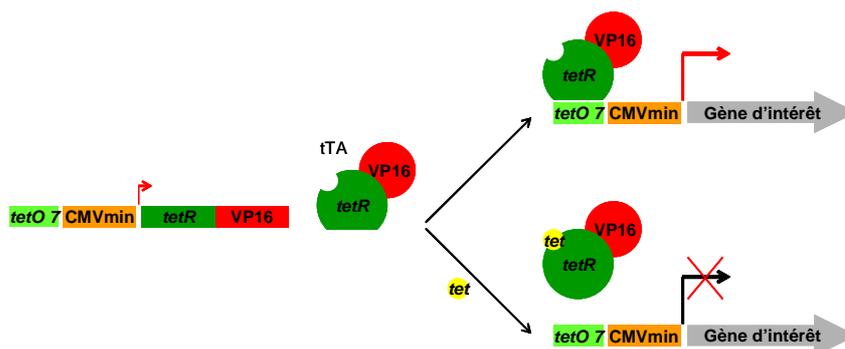


FIG. 2.1 – **Système Tet-Off développé par Gossen et Bujard [239]** : en absence de tétracycline, la transcription est activée ; en présence de tétracycline, la transcription est inhibée.

Le résultat de cette association est de créer un activateur de transcription eucaryote sensible à la tétracycline tTA : en absence de tétracycline il se fixe sur un élément de réponse TRE situé en amont d'un promoteur CMV minimal. En présence de tétracycline, la protéine de fusion subit un changement de conformation et ne se lie plus sur l'élément de réponse, il n'y a plus d'activation de transcription. L'élément de réponse TRE est constitué de sept copies de l'opérateur tetO sur

lequel le répresseur tetR se fixe avec une très grande spécificité.

En appliquant le système Tet-Off à la transcription d'un ARN antisens (figure 2.2) on obtient un système de régulation dans lequel :

- en absence de tétracycline la transcription d'un ARN antisens entraîne la présence des deux ARN sens et antisens complémentaires conduisant à l'inhibition de l'expression du gène d'intérêt.
- en présence de tétracycline la protéine activatrice de transcription subit un changement conformationnel, ne se lie plus sur l'élément de réponse en amont du promoteur CMV minimal et n'active donc plus la transcription de l'ARN antisens. Il n'y a donc pas d'inhibition de l'expression du gène d'intérêt.

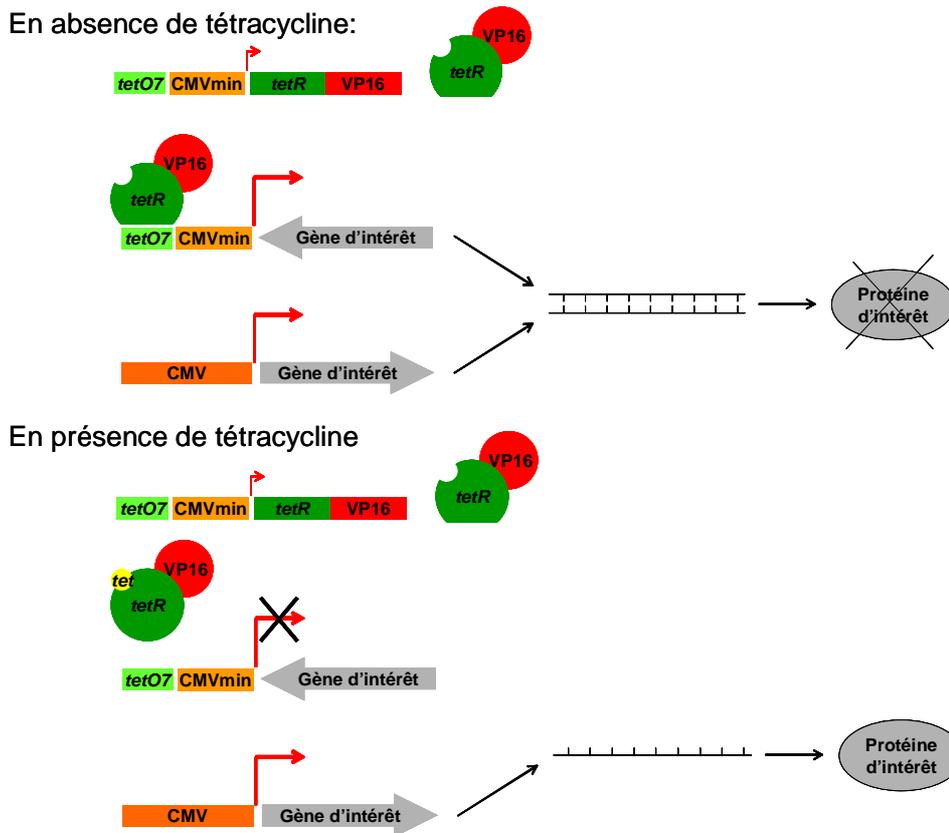


FIG. 2.2 – *Stratégie antisens conditionnel*

On espère donc par cette stratégie combinant un système Tet-Off et une stratégie antisens réduire l'expression basale à son minimum en absence d'inducteur.

2.4 Constructions plasmidiques

Trois gènes dont l'expression est facilement quantifiable sont utilisés dans cette étude : la phosphatase alcaline humaine sécrétée (hSeAP), la luciférase cytoplasmique de *Photinus pyralis* (Luc+) et l'érythropoïétine de souris (mEpo). Les deux premiers sont utilisés comme gènes rapporteurs ; l'Epo est plus précisément utilisé pour tester de façon simple l'efficacité du système *in vivo* puisqu'il induit de façon très sensible un effet physiologique facile à mesurer : l'hématocrite.

La moindre variation du niveau d'Epo dans l'organisme se répercute sur le niveau d'hématocrite [292]. Par ailleurs l'Epo est un gène thérapeutique qui peut être utilisé dans de nombreuses maladies telles que l'anémie ou la β -thalassémie [293].

Nous avons donc utilisé les plasmides pXL3010 (hSeAP), pXL3031 (Luc+) et pXL3348 (mEpo) codant ces trois gènes respectivement sous contrôle d'un promoteur CMV (figure 2.3 et voir Chapitre Matériel et Méthodes).

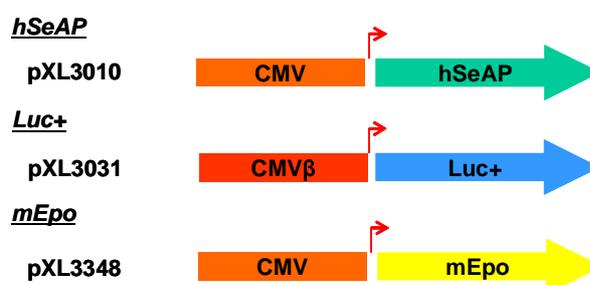


FIG. 2.3 – *Cassettes d'expression sens utilisées pour le système de régulation.* Les trois gènes sont sous contrôle d'un promoteur CMV permettant une transcription constitutive des ARN sens correspondants.

NB : pour des raisons de clarté, nous nommerons «plasmide antisens» un vecteur plasmidique contenant un gène en orientation antisens, et de la même façon «plasmide sens» un vecteur plasmidique contenant un gène en orientation sens.

2.5 Stratégie antisens

Le projet est basé sur une stratégie antisens, et dans notre cas particulier sur l'inhibition de l'expression d'un gène par un ARN antisens de séquence complémentaire transcrit directement dans la cellule cible et porté par un vecteur d'expression eucaryote. La première étape consiste donc à vérifier qu'un ARN antisens peut effectivement inhiber la traduction d'un gène (qui lui est complémentaire) et ainsi conduire à l'absence d'expression.

Pour cette première étude, deux plasmides antisens ont été construits : le plasmide pSeAPAS et le plasmide pLucAS contenant respectivement la hSeAP et la Luc+ en orientation antisens sous contrôle d'un promoteur CMV (figure 2.4 et voir Chapitre Matériel et Méthodes).

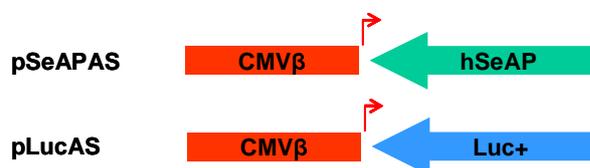


FIG. 2.4 – *Cassettes d'expression antisens utilisées pour le système de régulation.* Les deux gènes sont en orientation antisens sous contrôle d'un promoteur CMV permettant une transcription constitutive des ARN antisens correspondants.

Le gène d'intérêt a été positionné en orientation antisens sur le vecteur d'expression initial en conservant donc le site de polyadénylation initial : cela signifie d'une part que l'ARN antisens aura une séquence de polyadénylation et d'autre part que les sites de polyadénylation des deux

ARN sens et antisens sont identiques (SV40 polyA), ces deux points présentant chacun un intérêt. McCall et al. ont en effet observé qu'une séquence de polyadénylation sur l'ARN antisens dans le cadre d'une stratégie antisens conduisait à une meilleure inhibition de l'expression probablement par une augmentation de la stabilité de l'ARN antisens. Par ailleurs si les signaux polyA sont identiques, on peut supposer un trafic de l'ARN antisens similaire à l'ARN sens ciblé entraînant des localisations cellulaires communes et/ou une action de l'antisens dans le cytoplasme et non dans le noyau [289].

Ce concept de co-localisation des ARN antisens avec les ARN ciblés a été longuement discuté par Arndt et al. dans une revue très détaillée [294]. De nombreux progrès au niveau de la compréhension de l'architecture globale du noyau, de la structure de la chromatine et du métabolisme de l'ARN fournissent des informations utiles et nécessaires à l'élaboration de nouvelles approches pour améliorer la régulation de l'expression des gènes par une stratégie antisens. Ces études montrent que la position des gènes à l'intérieur du noyau n'est pas aléatoire et que les transcrits produits pas ces gènes suivent un parcours spécifique lors de la migration vers le cytoplasme.

Un grand nombre de facteurs peuvent influencer sur l'efficacité d'une stratégie antisens : la vitesse de transcription de l'ARN antisens, la stabilité de l'ARN antisens, la vitesse d'hybridation *in vivo* et la localisation du gène codant l'antisens par rapport au gène cible dans le génome. L'accessibilité de deux ARN complémentaires peut être divisée en deux catégories : (i) l'accessibilité locale, définie par la structure secondaire et tertiaire des deux ARN et par leurs interactions avec des protéines et (ii) l'accessibilité cellulaire, c'est-à-dire la capacité de deux transcrits de se retrouver dans une cellule (même région cellulaire) étant donné la complexité du procédé et des voies de transport pour les différents ARN.

2.5.1 Inhibition *in vitro* de l'expression d'un gène par un ARN antisens

- Une co-transfection transitoire est réalisée sur des fibroblastes de souris (NIH/3T3) avec soit :
- le plasmide sens pXL3010 codant la phosphatase alcaline sécrétée humaine hSeAP et différentes quantités de plasmide antisens pSeAPAS correspondant
 - le plasmide sens pXL3031 codant la luciférase luc+ et différentes quantités de plasmide antisens pLucAS correspondant.

La quantité totale de plasmide transfecté a été maintenue égale à 1 μ g par puits en ajoutant le plasmide pXL3296 vide (sans séquence codante) si nécessaire.

Par dosage de la phosphatase alcaline sécrétée dans le surnageant de culture (figure 2.5A) ou par dosage de la luciférase dans le lysat cellulaire (figure 2.5B), on observe que la co-transfection d'une quantité équimolaire de plasmide sens et antisens conduit à une inhibition de l'expression d'au moins 90%. Des quantités supérieures de plasmide antisens n'augmentent pas de façon significative l'inhibition.

Nous avons par ailleurs effectué une RT-PCR à partir de l'ARN extrait du lysat cellulaire pour vérifier la fonctionnalité des deux plasmides par la présence des deux transcrits sens et antisens (figure 2.6).

2.5.2 Spécificité de l'antisens *in vitro*

Pour vérifier la spécificité de l'ARN antisens pour son ARN sens correspondant, nous avons testé l'effet de l'ARN antisens de la phosphatase alcaline sécrétée humaine sur l'expression de la luciférase et réciproquement l'effet de l'ARN antisens de la luciférase sur l'expression de la phosphatase alcaline sécrétée humaine. Pour cela plusieurs co-transfections sont réalisées sur des

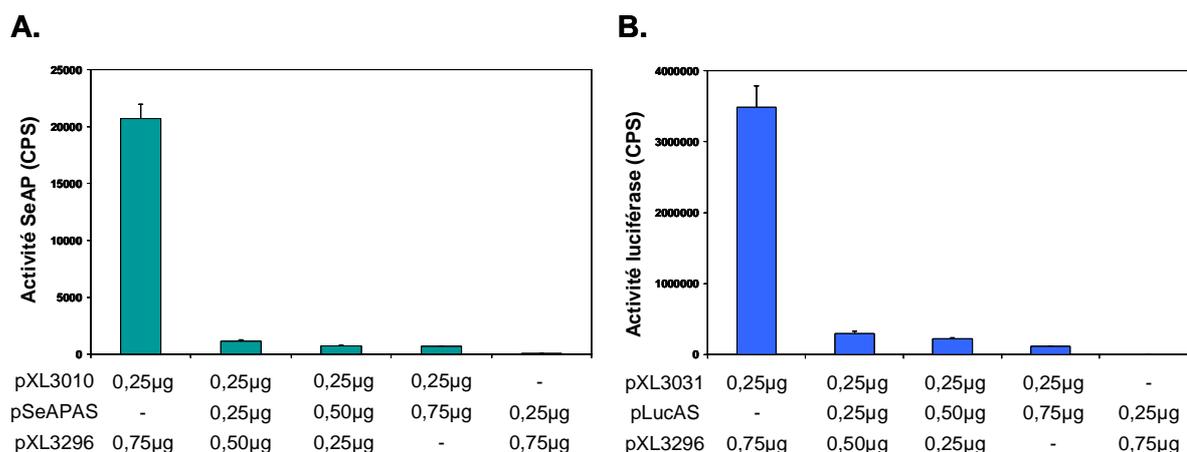


FIG. 2.5 – *Inhibition in vitro de l'expression d'un gène par un antisens correspondant.* Les transfections sont réalisées sur des cellules NIH/3T3 avec 6 nmoles RPR120535/µg d'ADN. Les dosages sont effectués 48h après transfection dans le surnageant de culture pour la hSeAP (A.) et dans le lysat cellulaire pour la luc+ (B.). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD de triplicata et sont exprimés en CPS/µg de protéine.

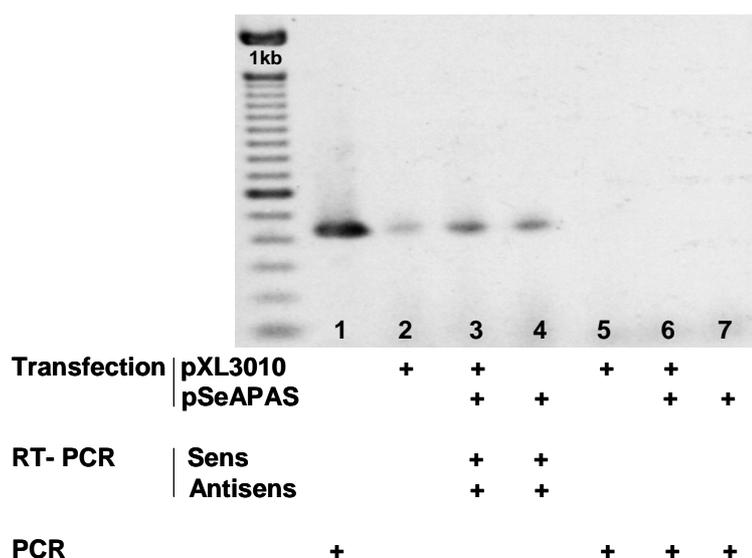


FIG. 2.6 – *Analyse par RT-PCR des différents transcrits dans le lysat cellulaire après transfection.* Une RT spécifique est effectuée avec les amorces appropriées avant amplification par PCR d'un fragment de 418pb de l'ADNc de la hSeAP (amorce sens : 5'cgatcatgttcgacgagcc3', amorce antisens : 5'ccagtcg-caggggtgtag3'). Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. En contrôle une PCR est effectuée directement sur l'ARN extrait et sur le plasmide pXL3010

cellules NIH/3T3 avec les plasmides sens pXL3010 (hSeAP) ou pXL3031 (luc+) combinés chaque fois avec soit le plasmide antisens pSeAPAS soit le plasmide antisens pLucAS.

Les dosages de la hSeAP (figure 2.7A) ou de la luciférase (figure 2.7B) nous montrent que la co-transfection d'un plasmide sens et d'un plasmide antisens correspondant conduit à une inhibition de plus de 90% de l'expression, comme montré précédemment (figure 2.5). Par contre aucune inhibition significative n'est observée si l'ARN antisens transcrit n'est pas complémentaire

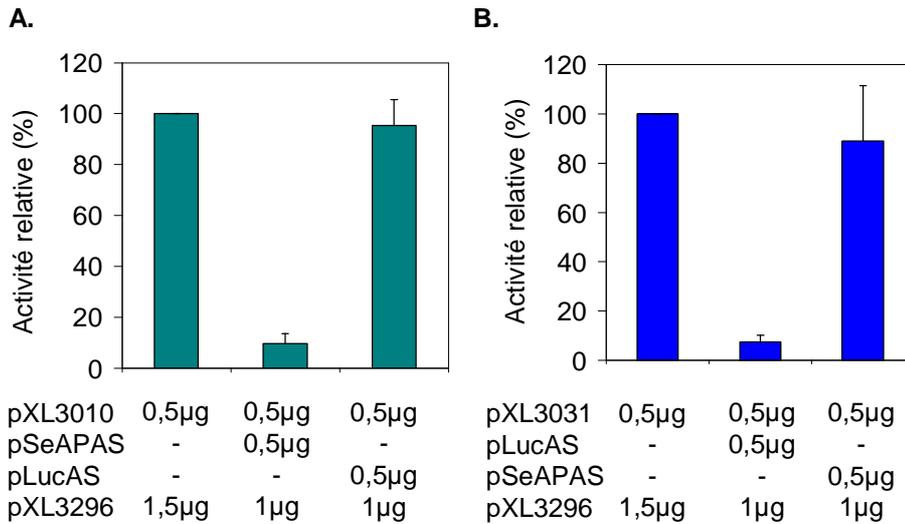


FIG. 2.7 – *Spécificité de l'inhibition par un antisens in vitro*. Les transfections sont réalisées sur des cellules NIH/3T3 avec 6 nmoles RPR120535/ μg d'ADN. Les dosages sont effectués 48h après dans le surnageant de culture pour la hSeAP (A.) et dans le lysat cellulaire pour la luc+ (B.). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD de triplicata et sont exprimés en pourcentage de l'expression du gène rapporteur seul.

de l'ARN sens. Il y a donc bien une spécificité de l'inhibition de l'expression.

2.5.3 Inhibition *in vivo* de l'expression d'un gène par un ARN antisens

Au vu de cette bonne efficacité d'inhibition de l'expression obtenue *in vitro* sur des cellules, nous réalisons un essai *in vivo* sur des souris SCID (Severe Combined Immune Deficiency). Il est indispensable de travailler avec des souris SCID immunodéficientes pour éviter toute réaction immunitaire puisque nous avons utilisé comme gène rapporteur la phosphatase alcaline sécrétée humaine, facile à doser régulièrement par prélèvement de sang.

La première étape consiste à vérifier s'il est indispensable de co-transfecter simultanément les plasmides sens et antisens ou s'il est possible d'obtenir une inhibition de l'expression en transfectant plus tardivement le plasmide antisens. Ce point est particulièrement intéressant pour la thérapie génique si l'expression du gène thérapeutique devait brusquement être interrompue pour une raison quelconque.

Un premier groupe de souris (groupe 1) est injecté et électrotransféré avec le plasmide pXL3010 codant la hSeAP. Un second groupe (groupe 2) est traité par co-injection et électrotransfert des plasmides pXL3010 et pSeAPAS, alors qu'un troisième groupe (groupe 3) est traité avec le plasmide pXL3010 et 21 jours plus tard avec le plasmide pSeAPAS. Enfin un dernier groupe (groupe 4) est traité avec le plasmide pSeAPAS uniquement (groupe non représenté figure 2.8). La cinétique d'expression de la phosphatase alcaline sécrétée humaine est suivie pendant 85 jours par dosage dans le sérum.

Les souris du groupe 1 ont une cinétique d'expression comparable à d'autres cinétiques obtenues au laboratoire [167] : le niveau augmente jusqu'à 7 jours puis décroît légèrement mais se maintient au cours du temps. Pour les souris du groupe 2 dans lequel les deux plasmides sens et antisens ont été co-injectés, aucune expression de la hSeAP n'est détectée. Le groupe 3 a le même profil cinétique que le groupe 1 sans différence significative. Pour le groupe 4 traité avec

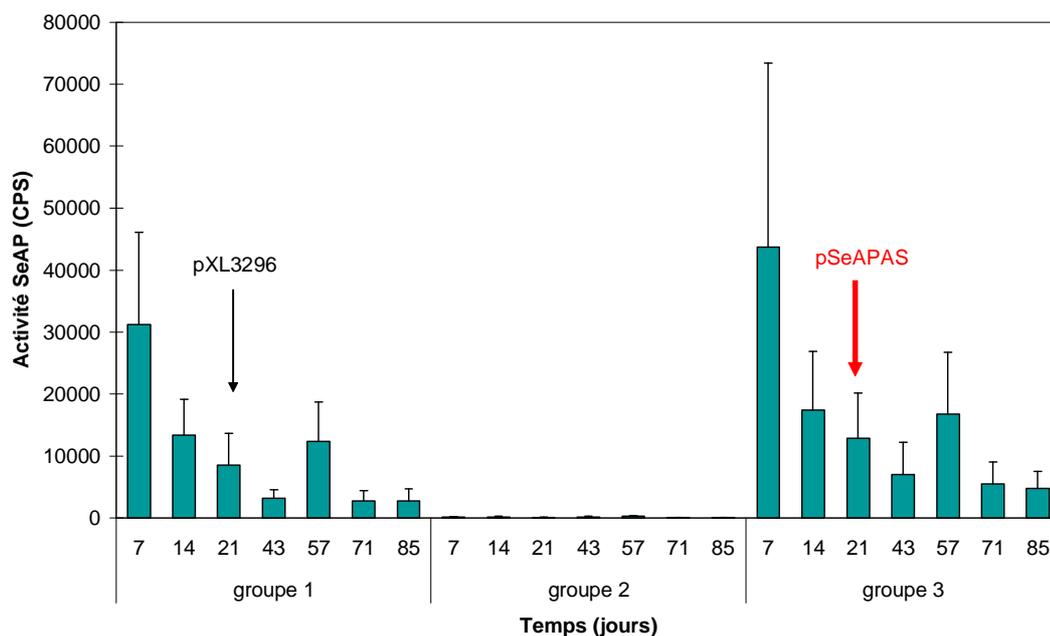


FIG. 2.8 – *Inhibition de l'expression par un antisens in vivo*. Les souris (SCID, 9 animaux/groupe) sont injectées et électrotransférées dans le muscle tibial cranial avec une solution d'ADN dans du NaCl 0,9% : groupe 1 : 30 μ g de pXL3010 (hSeAP) à J0 + 30 μ g de pXL3296 à J22; groupe 2 : Co-injection de 30 μ g de pXL3010 + 30 μ g de pSeAPAS à J0; groupe 3 : 30 μ g de pXL3010 at J0 + 30 μ g de pSeAPAS à J22. La flèche indique le jour du second électrotransfert (J22). Des échantillons de sang sont prélevés régulièrement aux temps indiqués et l'activité hSeAP est mesurée dans le sérum. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD.

le plasmide antisens pSeAPAS uniquement, aucune expression de la hSeAP n'est détectée. Ce groupe sert de contrôle interne.

Ces résultats montrent tout d'abord que la co-injection suivie d'un électrotransfert de deux plasmides sens et antisens respectivement conduit à l'extinction totale de l'expression de ce gène, résultats déjà suggérés *in vitro*, mais de façon encore plus forte ici puisque aucune activité hSeAP n'est détectée dans le sérum. Par contre l'injection et électrotransfert du plasmide antisens trois semaines après l'injection et électrotransfert du plasmide sens correspondant n'a aucun effet sur l'expression de la hSeAP. Cette expérience a été renouvelée plusieurs fois sans succès. Ceci signifie que l'inhibition de l'expression d'un gène exogène par l'ARN antisens correspondant ne peut être effective que si les deux plasmides sont co-injectés.

Une RT-PCR est ensuite effectuée à partir d'ARN totaux extraits de deux muscles des différents groupes pour vérifier la présence des transcrits sens et antisens dans chaque cas (figure 2.9). La transcription inverse est réalisée avec des amorces spécifiques du gène hSeAP en orientation sens ou antisens et les transcrits obtenus sont ensuite amplifiés par PCR puis révélés par autoradiographie après hybridation avec une sonde spécifique de la hSeAP marquée au 32 P.

Nous confirmons la transcription *in vivo* des deux ARN messagers sens et antisens grâce au groupe 1 pour l'ARN sens (ligne 10, bande à 418pb) et grâce au groupe 4 pour l'ARN antisens (ligne 6, bande à 418pb). En effet ces deux groupes de souris ont été injectés et électrotransférés avec un seul plasmide dans chaque cas : le plasmide pXL3010 pour le groupe 1, et le plasmide pSeAPAS pour le groupe 4.

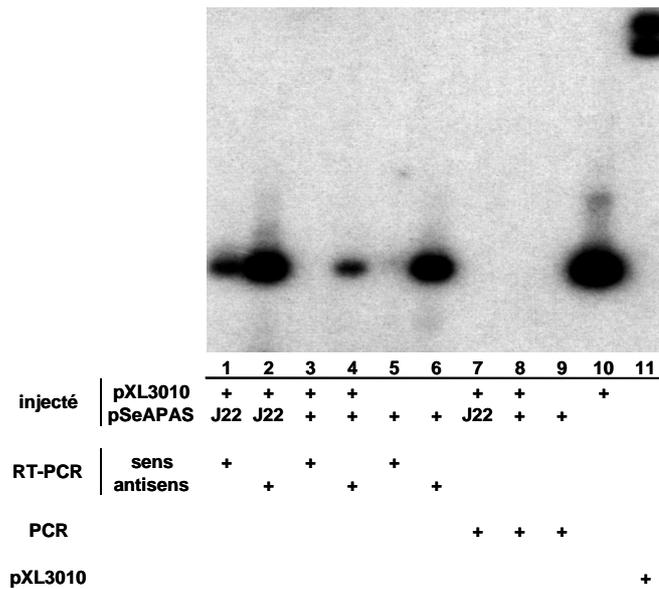


FIG. 2.9 – *Analyse par RT-PCR des différents transcrits dans les muscles squelettiques.* Les muscles sont prélevés et 2 muscles par groupe sont rassemblés pour extraire les ARN totaux. Une RT spécifique est effectuée avec les amorces appropriées avant amplification par PCR d'un fragment de 418pb de l'ADNc de la hSeAP (amorce sens : 5'cgatcatgttgcagcagcc3', amorce antisens : 5'ccagtcgacggctgtag3'). Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse, transférés sur une membrane de nylon et hybridés avec une sonde 5'tccaggcaggcgcgaaggc3' marquée au ^{32}P avant autoradiographie. 1,2 : détection des transcrits sens et antisens des muscles du groupe 3 (injection de l'antisens à J22) ; 3,4 : détection des transcrits sens et antisens des muscles du groupe 2 (co-injection des plasmides sens et antisens) ; 5,6 : détection des transcrits sens et antisens des muscles du groupe 4 (injection de l'antisens uniquement) ; 7,8,9 : PCR contrôle sur l'ARN sans étape de transcription inverse ; 10 : PCR contrôle sur le pXL3010 ; 11 : plasmide pXL3010 (contrôle pour l'hybridation).

Dans le groupe 3, pour lequel le plasmide pSeAPAS codant la hSeAP en orientation antisens a été injecté et électrotransféré trois semaines après le plasmide codant la hSeAP, les deux transcrits sont détectés (ligne 1 et 2). On peut donc affirmer que les deux plasmides sens et antisens ont bien été transfectés dans les cellules du muscle et que les ARN correspondants ont bien été transcrits. Cependant comme aucune inhibition de la hSeAP n'a été observée, on peut supposer soit que les cellules transfectées par le plasmide antisens lors du second électrotransfert ne sont pas les mêmes que les cellules transfectées par le plasmide sens lors du premier électrotransfert, soit que les ARN complémentaires ne sont pas co-localisés entre les deux injections. Dans le cadre de la thérapie génique, il serait très intéressant de pouvoir éteindre l'expression d'un gène en injectant uniquement le plasmide antisens lorsque nécessaire. Mais ce protocole ne nous a pas donné de résultat concluant. Ceci peut s'expliquer par le fait que le transfert de gène *in vivo* est plus ou moins localisé au site de l'injection. Après une deuxième injection, puisque les sites d'injections sont différents, les fibres musculaires transfectées doivent être différentes. De plus les fibres musculaires sont des cellules polynucléées : même si les mêmes cellules ont été transfectées par le plasmide antisens, il y a peu de chance que le même noyau soit transfecté, ce qui est plus probable dans le cas d'une co-injection.

De façon similaire, Golzio et al. ont récemment montré, en utilisant la technique de l'électrotransfert dans des conditions semblables aux nôtres, que la co-transfection d'un plasmide codant la GFP avec des siRNA spécifiques de la GFP conduit à une inhibition quasi-totale de l'expres-

sion du gène pendant 3 semaines. Par contre lorsque la même quantité de siRNA est injectée 48 heures après l'injection du plasmide pEGFP-C1, l'inhibition n'est que de 20% [214]. Il peut s'agir d'un problème de quantité de siRNA internalisés par les cellules du muscle mais très vraisemblablement aussi d'un problème de co-localisation. L'avantage des siRNA est d'inhiber l'expression du gène dans le cytoplasme : il n'est pas nécessaire contrairement à notre approche de parvenir jusqu'au noyau pour transcrire l'antisens.

De façon surprenante on observe également que dans le groupe 2, pour lequel les deux plasmides ont été co-injectés et électrotransférés, seul l'ARN antisens est détecté (ligne 3 et 4). Cependant ce résultat reste en accord avec le dosage SeAP effectué qui ne montre aucune activité SeAP pour ce groupe de souris. Ceci suggère que les plasmides sens et antisens co-injectés ont transfecté les mêmes cellules, et dans ce cas, la présence des deux ARN complémentaires entraîne l'absence d'expression de la protéine. Ceci rejoint l'étude de McCall et al. : les deux ARN complémentaires ayant le même signal de polyadénylation (SV40 late polyA signal), l'ARN antisens est plus stable, il se retrouve localisé dans le même compartiment cellulaire que l'ARN sens, sans doute dirigé dans le cytoplasme, il en résulte une meilleure inhibition [289].

2.6 Système de régulation par un antisens conditionnel

Nous avons vérifié qu'un ARN antisens pouvait inhiber de façon spécifique et quasi-totale l'expression d'un gène qui lui est complémentaire. La deuxième étape du projet consiste donc à étudier si cette inhibition de l'expression par un ARN antisens peut être régulée, c'est-à-dire si la transcription régulée de l'ARN antisens complémentaire peut entraîner une extinction régulée de l'expression.

2.6.1 Evaluation du système de régulation *in vitro*

Pour cette étude, différents plasmides ont été construits : le plasmide pTet-SeAPAS, le plasmide pTet-LucAS et le plasmide pTet-EpoAS (figure 2.10). Ces différents plasmides contiennent respectivement le gène hSeAP, Luc+ ou mEpo en orientation antisens sous contrôle du promoteur TetP. Ils fonctionnent avec le plasmide pTet-tTAK, qui contient la protéine de fusion tTA activatrice de transcription et sensible à la tétracycline sous contrôle également du promoteur TetP.

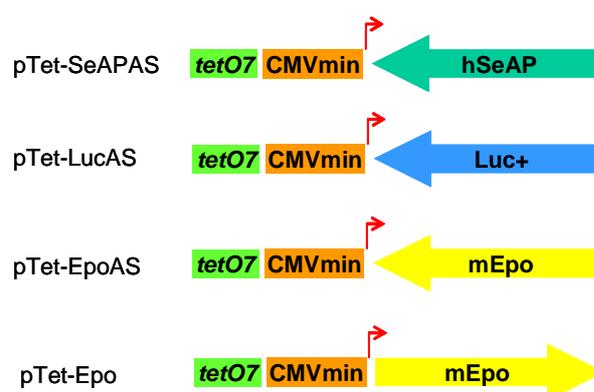


FIG. 2.10 – *Cassettes d'expression régulables utilisées pour le système de régulation.* Les différents gènes sont sous contrôle du promoteur TetP constitué de 7 copies de l'opérateur tetO en amont d'un promoteur CMV minimal.

Test du système Tet-Off *in vitro*

Une expérience préliminaire est effectuée pour vérifier la fonctionnalité du système Tet-Off. Nous utilisons pour cela le vecteur pTet-Epo contenant le gène de l'érythropoïétine sous contrôle du promoteur TetP inducible par la tétracycline pour pouvoir doser l'Epo dans le surnageant par ELISA.

Une transfection transitoire est réalisée sur des cellules NIH/3T3 avec dans un cas le plasmide pTet-Epo uniquement (lot 1) et dans un autre le plasmide pTet-Epo co-transfecté avec le plasmide pTet-tTAK avec ou non ajout de tétracycline (lot 2 +/- Tet). Dans tous les cas la quantité totale de plasmide transfecté a été maintenue égale à $1\mu\text{g}$ par puits en ajoutant le plasmide pTet-Splice vide si nécessaire (figure 2.11).

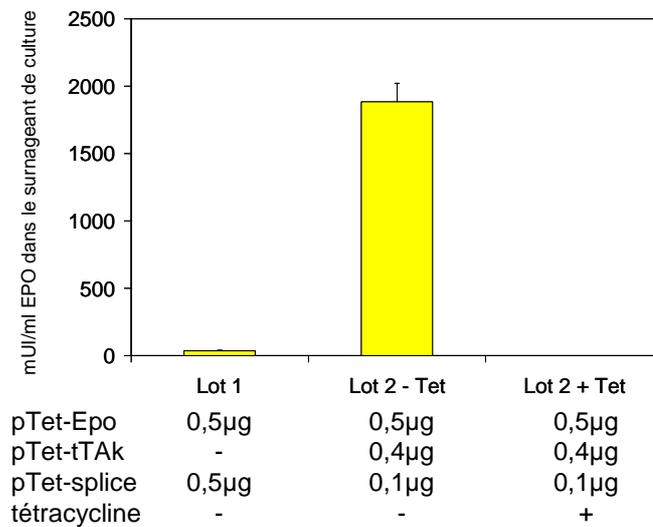


FIG. 2.11 – *Test in vitro du système Tet-Off*. La transfection est réalisée sur des cellules NIH/3T3 avec 6 nmoles RPR120535/ μg d'ADN. Les dosages de l'Epo sont effectués 48h après transfection dans le surnageant de culture. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD de duplicata et sont exprimés en mUI/ml de surnageant. La tétracycline est ajoutée à une concentration finale de $1\mu\text{g/ml}$.

On constate dans le lot 1 un niveau d'érythropoïétine quasi inexistant. Ce lot sert de contrôle négatif car le plasmide pTet-tTAK contenant la séquence codant la protéine de fusion tTA activatrice de transcription est absent. On constate ensuite dans le lot 2 une forte quantité d'érythropoïétine dans le surnageant de culture en absence de tétracycline, et un niveau d'érythropoïétine nul en présence de tétracycline. Ces résultats nous confirment premièrement que la protéine de fusion tTA est bien indispensable pour activer la transcription et deuxièmement que la tétracycline régule bien l'expression du gène Epo dans le sens Tet-Off : en présence de tétracycline, la transcription est bloquée totalement, en absence de tétracycline, la transcription est activée. Par ailleurs ce dosage semble montrer que le système ne fuit pas (lot 2 + Tet).

Dans notre cas nous allons utiliser ce système Tet-Off dans une stratégie antisens. Ce ne sera donc plus l'ARN sens dont la transcription sera régulée mais l'ARN antisens correspondant.

Test du système de régulation complet *in vitro*

Pour étudier l'efficacité *in vitro* du système de régulation complet composé de trois plasmides, une co-transfection transitoire est réalisée sur des cellules NIH/3T3 avec les différentes

constructions pour les trois gènes soit :

- pour la hSeAP : les plasmides pXL3010, pTet-SeAPAS et pTet-tTAK
- pour la Luc+ : les plasmides pXL3031, pTet-LucAS et pTet-tTAK
- pour l'Epo : les plasmides pXL3348, pTet-EpoAS et pTet-tTAK.

La quantité totale de plasmide transfecté a été maintenue égale à 1,5 μ g par puits en ajoutant le plasmide pTet-splice vide si nécessaire. Pour réprimer l'activité du promoteur TetP, nous avons ajouté dans le milieu de culture de la tétracycline à une concentration finale de 1 μ g/ml.

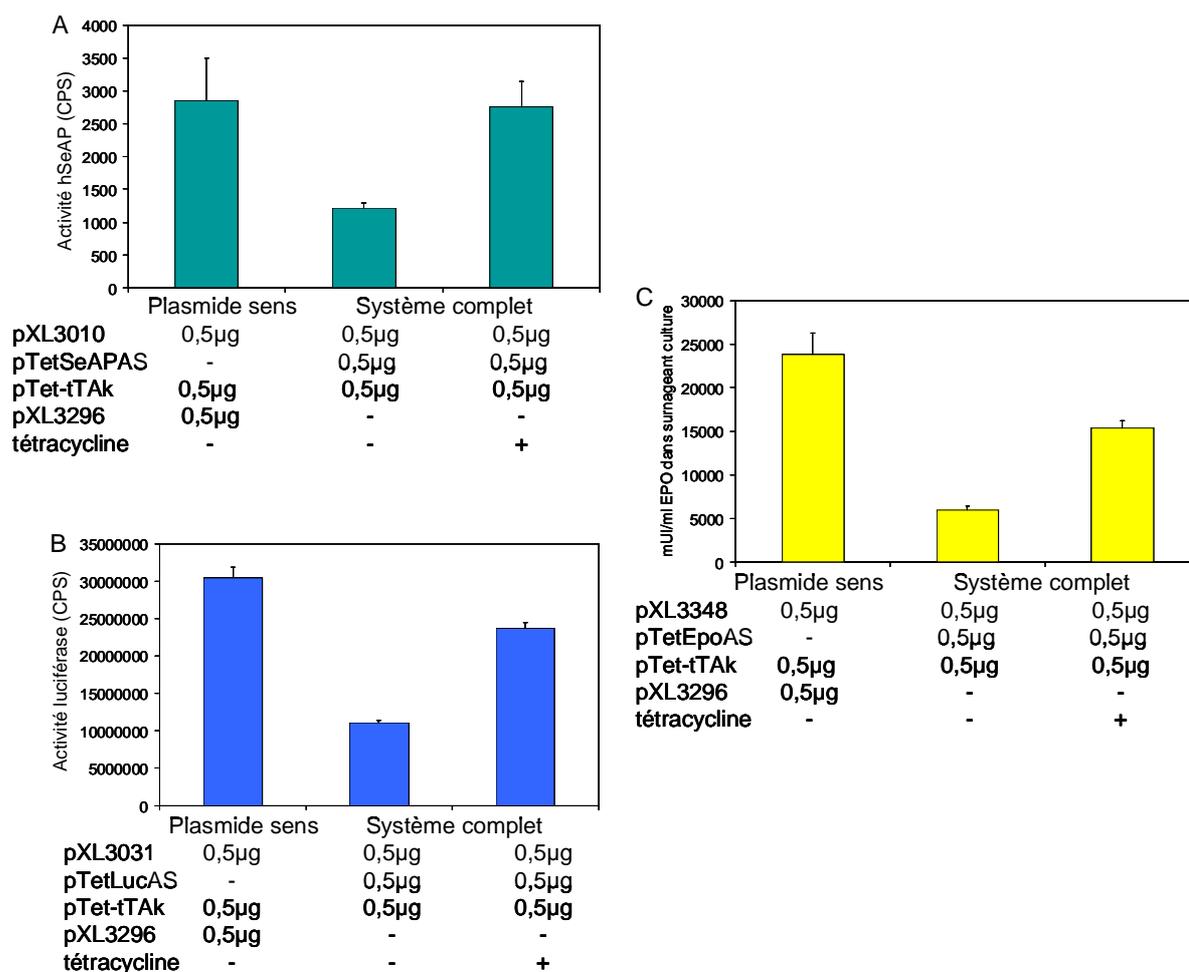


FIG. 2.12 – *Inhibition in vitro de l'expression par un système de régulation de l'antisens par la tétracycline.* Les transfections ont été réalisées sur des cellules NIH/3T3 en plaque 12 puits. La tétracycline est ajoutée à une concentration finale de 1 μ g/ml. Les dosages ont été effectués 48h après transfection dans le surnageant de culture pour la hSeAP (A) et l'Epo (C) et dans le lysat cellulaire pour la luc+ (B). Les résultats correspondent à la moyenne de triplicata \pm SD et sont exprimés en CPS (coups par seconde) pour la hSeAP et la Luc+ et en mUI/ml pour l'Epo.

En théorie, en absence de tétracycline, le transactivateur tTA se fixe sur l'élément de réponse TRE situé en amont du promoteur CMV minimal : il y a donc transcription d'ARN antisens qui inhibe l'expression du gène d'intérêt. Les résultats de la figure 2.12 (conditions -Tet du système complet) nous montrent que pour les trois gènes d'intérêt, en absence de tétracycline, la co-transfection des trois plasmides sens, antisens et pTet-tTAK conduit à une inhibition de

l'expression du gène d'intérêt.

En ajoutant la tétracycline, le transactivateur tTA subit un changement de conformation, ne se lie plus à l'élément de réponse TRE, il n'y a plus activation de la transcription de l'ARN antisens, mais uniquement transcription de l'ARN sens (transcrit de façon constitutive) et donc expression du gène d'intérêt. Effectivement les résultats de la figure 2.12 (conditions +Tet du système complet) nous montrent que, en présence de tétracycline, la co-transfection des trois plasmides du système conduit cette fois à l'expression du gène d'intérêt, à un niveau comparable à celui du plasmide sens seul (conditions plasmide sens).

Ces résultats démontrent que le transactivateur sensible à la tétracycline tTA permet la transcription conditionnelle de l'ARN antisens, qui à son tour contrôle l'expression du gène d'intérêt. Ces résultats ont été répétés avec trois gènes d'intérêt (hSeAP, Luc+ et mEpo) et sont donc indépendants de la séquence d'intérêt choisie.

Au vu des résultats, on peut conclure que le système de régulation complet inductible par la tétracycline fonctionne *in vitro*. Cependant on peut remarquer que le système fuit : le niveau basal n'est pas nul en absence de tétracycline. Plus précisément, on observe que le niveau d'inhibition (condition -Tet) est plus faible que le niveau d'inhibition obtenu précédemment lorsque le gène en orientation antisens était sous contrôle du promoteur constitutif CMV (cf. résultats de la figure 2.5 et 2.7). Cette fuite d'expression n'est pas due au système Tet-Off en lui-même, comme nous l'avons montré précédemment, mais vraisemblablement à la co-transfection de trois plasmides, qui est moins efficace que la transfection d'un seul ou deux plasmides [295].

Etude de la co-transfection de trois plasmides

Il semble fort probable que lorsque l'on co-transfecte trois plasmides, toutes les cellules transfectées n'internalisent pas forcément les trois plasmides. Même celles qui internalisent les trois plasmides n'expriment pas forcément les trois gènes correspondants. Pour vérifier cette hypothèse nous avons co-transfecté trois plasmides sur des cellules B16 (mélanomes de souris) et étudié le pourcentage de cellules exprimant un et/ou deux et/ou trois plasmides.

Nous utilisons pour cela

- le plasmide pEGFPC1 contenant le gène de la GFP, protéine fluorescente verte
- le plasmide pDsRed contenant le gène de la DsRed, protéine fluorescente rouge
- le plasmide pVaxLuc contenant le gène de la luciférase. Après la transfection, nous réalisons une immunofluorescence avec un anticorps de souris anti-luciférase puis un anticorps secondaire anti-IgG de souris marqué avec AMCA (fluorescence bleue).

Ainsi l'expression des trois gènes peut être visualisée directement sur les cellules fixées par microscopie de fluorescence (figure 2.13).

En étudiant par microscopie de fluorescence les cellules transfectées on observe des cellules uniquement vertes, rouges, bleues, des cellules à la fois vertes et rouges, vertes et bleues, rouges et bleues, et des cellules à la fois vertes, rouges et bleues (figure 2.13). Nous avons quantifié le pourcentage de cellules exprimant un, deux ou trois des gènes correspondants aux trois plasmides par observation de la fluorescence des cellules sur 14 champs différents. Nous obtenons en moyenne 11,6%(±6,2) de cellules exprimant un gène, 6,8%(±3,7) de cellules exprimant deux gènes, et 4,4%(±2,7) de cellules exprimant les trois gènes. La conclusion de cette étude est que lorsque l'on co-transfecte trois plasmides, toutes les cellules transfectées n'internalisent pas forcément les trois plasmides ou du moins n'expriment pas forcément les trois gènes correspondants.

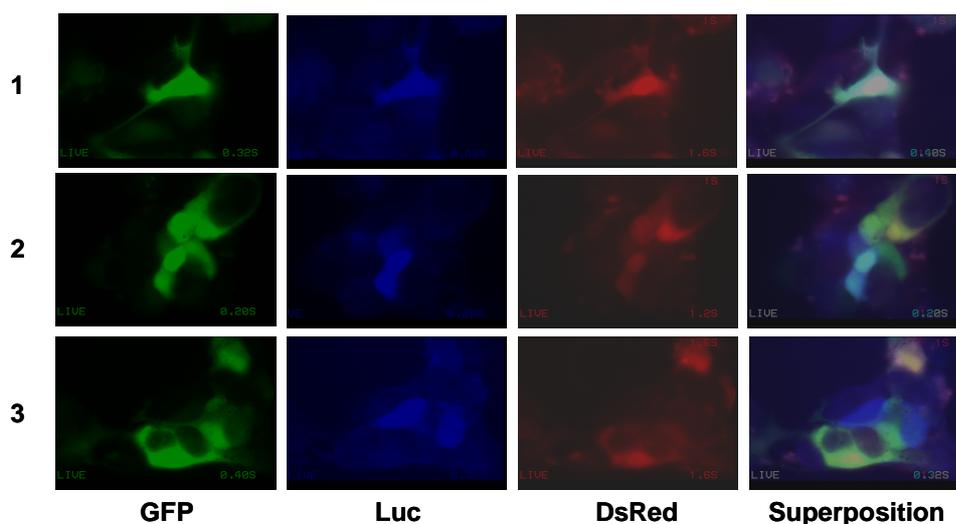


FIG. 2.13 – *Etude de la co-transfection in vitro de trois plasmides.* La co-transfection a été réalisée sur des cellules B16 en plaque 12 puits avec 4nmoles RPR209120/ μg d'ADN : 0,3 μg pVaxLuc + 0,3 μg pEGFPC1 + 0,3 μg pDsRed. Une immunofluorescence a été effectuée 48h après transfection avec l'anticorps anti-luciférase (SIGMA, L2164, 2mg/ml) dilué au 1/200^e et l'anti-mouse IgG-AMCA (Vector AbCys, CI-2000, 1.5mg/ml) dilué au 1/100^e. Les cellules après immunofluorescence sont observées au microscope à fluorescence avec un grossissement X100. Trois champs sont représentés avec pour chaque, l'observation aux trois filtres de fluorescence et la superposition des trois.

Conclusion sur l'étude du système *in vitro*

Ainsi la fuite de notre système de régulation est sans doute due aux cellules ayant transcrit seulement un ou deux des trois gènes composant le système (cf. le tableau récapitulatif 2.1).

Nb. de plasmides	Plasmide	-Tet	+Tet
1	sens	+	+
1	antisens		
1	pTet-tTAK		
2	sens+antisens	+	+
2	sens+pTet-tTAK	+	+
2	antisens+pTet-tTAK		
3	sens+antisens+pTet-tTAK		+

TAB. 2.1 – *Schéma explicatif de la co-transfection des trois plasmides constituant le système de régulation.* Les symboles «+» indiquent l'expression de la protéine d'intérêt. Abréviations : Nb. : nombre; Tet : tétracycline

Les cellules internalisant uniquement le plasmide sens ou uniquement les plasmides sens et antisens sans le plasmide pTet-tTAK transcrivent l'ARN sens correspondant et conduisent à une expression résiduelle. Les cellules internalisant uniquement le plasmide antisens ou uniquement les plasmides antisens et pTet-tTAK transcrivent des ARN exogènes ne conduisant à aucune expression.

Pour que le système fonctionne sans fuite il faudrait que chaque cellule transfectée internalise les trois plasmides ET expriment les trois gènes portés par ces trois plasmides. La différence

observée entre les conditions -Tet et +Tet dans les schémas de la figure 2.12 prouve cependant que le système fonctionne. L'expression résiduelle est due aux cellules internalisant seulement un ou deux des trois plasmides transfectés constituant le système, parmi lesquels se trouve le plasmide sens.

Il serait intéressant d'étudier de la même façon la co-localisation de plusieurs gènes *in vivo* (co-injection et électrotransfert des mêmes trois plasmides et analyse sur coupes des muscles après immunomarquage). Apparemment l'électrotransfert et/ou la nature des cellules musculaires (myotubes) permettent une bien meilleure co-localisation des trois plasmides *in vivo* par rapport aux données *in vitro*. Par exemple la co-injection des plasmide sens et antisens de la hSeAP a conduit à une inhibition totale de l'expression (figure 2.8).

2.6.2 Régulation à long terme de l'expression de la hSeAP *in vivo* avec un système à trois plasmides

La fuite du système observée *in vitro* avait déjà été obtenue *in vitro* également avec le gène rapporteur hSeAP pour l'inhibition par un antisens (figure 2.5A). Cependant par la suite, les résultats obtenus *in vivo* par électrotransfert avaient été beaucoup plus satisfaisants avec un bruit de fond quasi nul et une bonne induction (figure 2.8). Nous décidons donc là aussi d'évaluer l'efficacité du système de régulation complet *in vivo*.

Pour tester l'efficacité du système de régulation *in vivo*, 20 souris SCID sont co-injectées et électrotransférées avec les plasmides pXL3010, pTet-SeAPAS et pTet-tTAk (figure 2.14). Sur ces 20 souris, 10 d'entre elles ne reçoivent aucun autre traitement (groupe 1), et les 10 autres (groupe 2) reçoivent régulièrement de la doxycycline dans leur boisson à une concentration finale de 400mg/l dans du sucrose 5%. On utilise ici de la doxycycline qui est un analogue de la tétracycline mais plus stable *in vivo*.

Dans le groupe 1, les souris n'ont jamais reçu de doxycycline tout au long de la cinétique. On détecte dans ce groupe une activité résiduelle très faible. Le transactivateur tTA active en permanence la transcription de l'ARN antisens, et la présence des deux ARN sens et antisens complémentaires entraîne l'inhibition de l'expression de la hSeAP. Par contre dans le groupe 2 qui a reçu de la doxycycline régulièrement pendant des périodes de 7 jours tout au long de la cinétique, une induction de l'activité SeAP est observée à chacun des traitements. Entre chaque induction l'activité hSeAP retombe à un niveau basal comparable à celui du groupe 1 et significativement différent du niveau induit. Cette régulation on/off a pu être détectée pendant au moins six mois. On peut remarquer que le niveau d'induction n'est pas le même tout au long de la cinétique, car il dépend de la quantité de doxycycline absorbée par chaque souris, et ce paramètre n'est pas contrôlable puisque la doxycycline est donnée dans leur boisson.

Ceci suggère que la co-transfection de trois plasmides par électrotransfert est efficace, permettant la régulation d'un gène exogène par un ARN antisens conditionnel *in vivo*. Une étude similaire faite par Martel et al. présente une régulation efficace de l'expression de facteurs antiangiogéniques après électrotransfert dans le muscle d'un système de régulation à trois plasmides : un plasmide codant le transgène, un plasmide codant le rtTA et un plasmide codant le tTS (silencer) [296]. Cette étude confirme là aussi que la co-injection et l'électrotransfert de trois plasmides est efficace *in vivo* dans le muscle en tout cas.

Cependant le léger niveau basal détecté dans le groupe de souris sans doxycycline suggère dans notre cas une légère fuite du système : nous avons donc décidé de placer les cassettes d'expression des plasmides sens et antisens sur un même vecteur. En effet dans notre cas il ne faut pas oublier qu'il faut que les ARN sens et antisens soient proches au sein même de la cellule pour une inhibition de l'expression efficace [294].

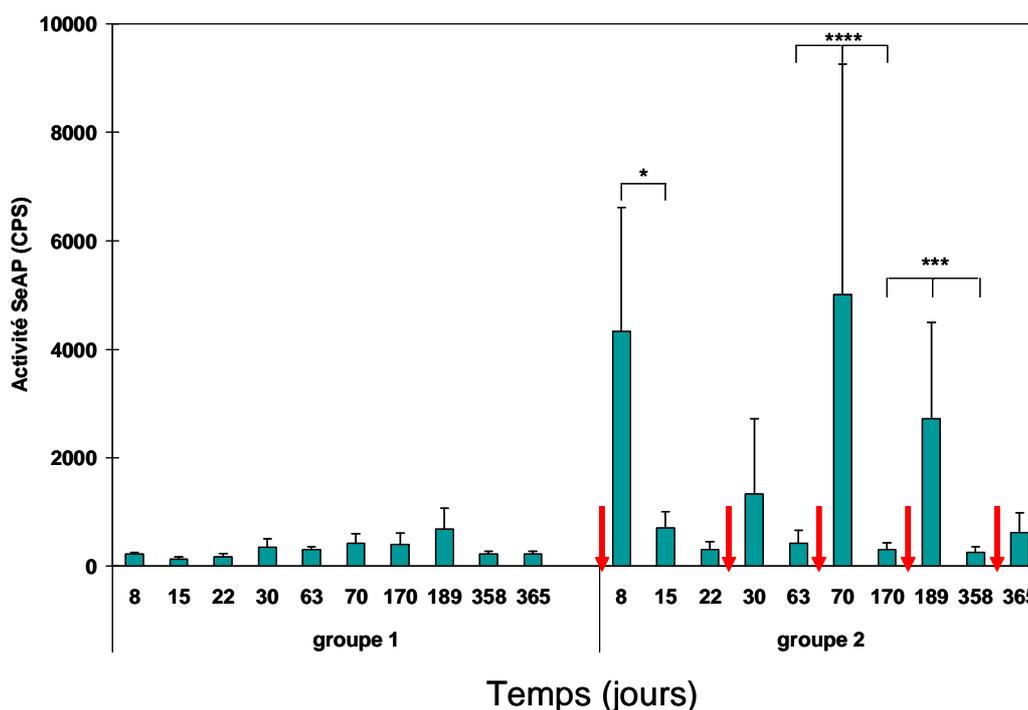


FIG. 2.14 – *Cinétique d'activité de la hSeAP dans le sérum de souris SCID avec des inductions répétées par la doxycycline.* 20 μ g de chaque plasmide pXL3010, pTetSeAPAS et pTet-tTAk sont injectés et électrotransférés dans le muscle tibial cranial de 20 souris SCID. 10 souris ne reçoivent aucun autre traitement (groupe 1), les 10 autres souris reçoivent périodiquement de la doxycycline dans leur boisson (groupe 2, flèches rouges). Des échantillons de sang ont été prélevés régulièrement aux temps indiqués (axe des abscisses) et l'activité hSeAP a été mesurée dans le sérum. La doxycycline a été ajoutée à l'eau de leur boisson pendant des périodes de 7 jours à une concentration finale de 400 mg/l avec 5% sucrose. Les résultats exprimés en CPS correspondent à la moyenne \pm SD des 10 souris pour chaque groupe. Notations des statistiques (test ANOVA) : différence significative avec * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

2.6.3 Régulation à long terme de l'expression de la hSeAP *in vivo* avec un système à deux plasmides

Constructions plasmidiques

Pour améliorer la co-localisation des trois plasmides et plus précisément, pour être sûr que les plasmides codant les ARN sens et antisens sont co-transfectés dans la même cellule, nous avons construit deux nouveaux plasmides pGJA14 et pGJA15-2 avec le gène rapporteur de la hSeAP (figure 2.15). Le plasmide pGJA14 est un vecteur biscistronique, il correspond au plasmide pXL3010 dans lequel on a inséré la cassette d'expression antisens du pTet-SeAPAS. Les deux cassettes d'expression ont été positionnées dans des directions opposées pour minimiser les interférences potentielles entre les deux promoteurs. Le plasmide pGJA15-2 est un vecteur d'expression convergent qui contient le gène de la SeAP encadré en orientation sens par le promoteur CMV et en orientation antisens par le promoteur minimal sensible à la tétracycline du pTet-Splice, TetP. L'ARN antisens dans ce dernier cas ne possède donc pas de signal de polyadénylation.

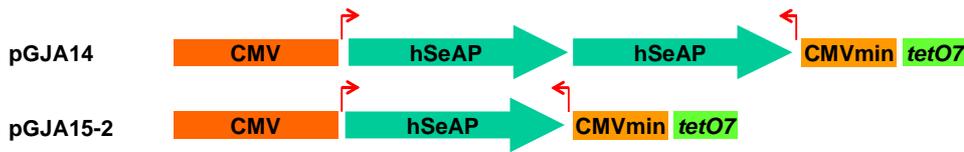


FIG. 2.15 – Cassettes d'expression utilisées pour le système de régulation à deux plasmides.

Test du système à deux plasmides *in vitro*

La fonctionnalité de ces plasmides est d'abord testée *in vitro*, co-transfectés avec le pTet-tTAK sur des cellules NIH/3T3.

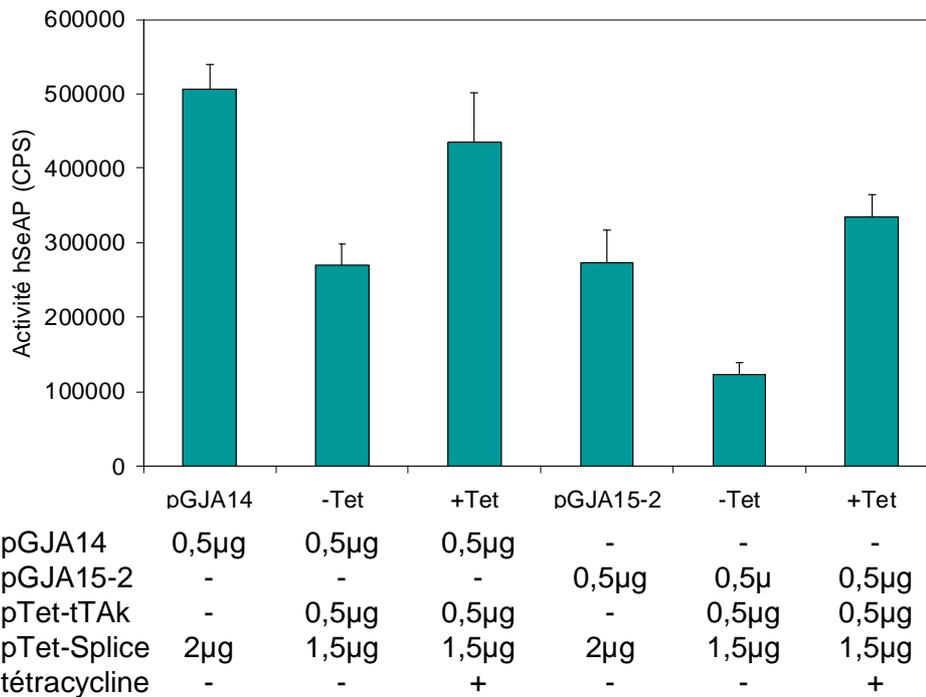


FIG. 2.16 – Test *in vitro* du système complet à deux plasmides. Les transfections ont été réalisées en plaque 6 puits sur des cellules NIH/3T3 avec 6 nmoles RPR120535/µg d'ADN. Les dosages sont effectués 48h après transfection dans le surnageant de culture. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD de 4 puits et sont exprimés en CPS. La tétracycline est ajoutée à une concentration finale de 1µg/ml.

On observe pour les deux constructions une régulation de l'expression de la hSeAP par la tétracycline : en absence de tétracycline (condition -Tet figure 2.16) l'ARN antisens inhibe l'expression de la hSeAP. En présence de tétracycline (condition +Tet figure 2.16), la transcription de l'ARN antisens est inhibée, il y a expression de hSeAP à un niveau comparable à celui des conditions contrôles (pGJA14 et pGJA15-2) qui ne transcrivent que l'ARN sens car l'activateur de transcription de l'ARN antisens tTA est absent. Cependant le niveau d'expression en absence de tétracycline est encore élevé. Nous avons tout de même testé le système de régulation à deux plasmides *in vivo* avec les deux plasmides pGJA14 et pGJA15-2.

Test du système à deux plasmides *in vivo*

Pour tester l'efficacité du système de régulation constitué de deux plasmides *in vivo*, 40 souris SCID sont co-injectées et électrotransférées avec les plasmides pGJA14 et pTet-tTAK (20 souris, 20 μ g de chaque plasmide en unilatéral, groupes 1 et 2), ou avec les plasmides pGJA15-2 et pTet-tTAK (20 souris, 20 μ g de chaque plasmide en unilatéral, groupes 3 et 4). De la doxycycline est ajoutée dans la boisson des groupes 2 et 4 à raison de 400mg/l dans du sucrose 5% pendant des périodes de 7 jours. Des échantillons de sang ont été prélevés régulièrement aux temps indiqués (axe des abscisses de la figure 2.17) et l'activité hSeAP a été mesurée dans le sérum.

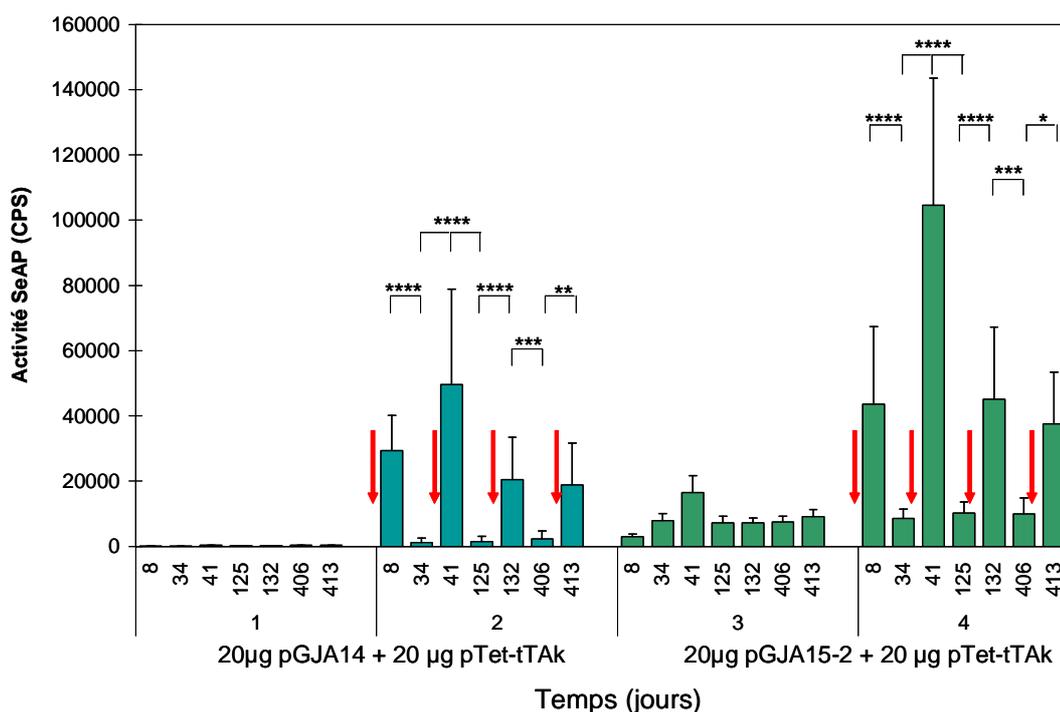


FIG. 2.17 – Cinétique d'activité de la hSeAP dans le sérum de souris SCID avec des inductions répétées par la doxycycline, en utilisant un système à deux plasmides. Les plasmides sont injectés et électrotransférés dans le muscle tibial cranial de souris SCID (10 souris par groupe). Lorsque nécessaire (flèches rouges) de la doxycycline est ajoutée (400mg/l dans 5% sucrose) pendant des périodes de 7 jours. Des échantillons de sang ont été prélevés régulièrement aux temps indiqués (axe des abscisses) et l'activité hSeAP a été mesurée dans le sérum. Les résultats exprimés en CPS correspondent à la moyenne \pm SD des 10 souris pour chaque groupe. Notations des statistiques (test ANOVA) : différence significative avec * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Dans le groupe 1 qui n'a jamais reçu de doxycycline, aucune activité SeAP n'est détectée pendant les 413 jours de la cinétique.

Dans le groupe 3 par contre, qui n'a lui non plus jamais reçu de doxycycline, un niveau basal assez élevé est mesuré pendant la même période.

Sept jours après l'électrotransfert, on observe une augmentation significative du niveau de SeAP dans les groupes 2 et 4 traités à la doxycycline. L'activité SeAP retourne à un niveau basal lorsque la doxycycline est retirée. Ce niveau basal est comparable à celui du groupe 1 pour le groupe 2 et du groupe 3 pour le groupe 4. La régulation on/off a pu être répétée plusieurs fois

pendant plus d'un an avec des différences significatives lors des traitements avec la doxycycline.

Ceci suggère donc qu'un plasmide comportant à la fois une cassette d'expression sens et une antisens correspondante peut être utilisé pour réguler l'expression d'un gène exogène. Cette construction permet *in vivo* de diminuer fortement le niveau basal.

Par contre il semble préférable d'utiliser un vecteur plasmidique possédant deux cassettes d'expression indépendantes plutôt que d'utiliser un vecteur plasmidique convergent qui contient le gène d'intérêt encadré en orientation sens par le promoteur CMV et en orientation antisens par le promoteur minimal sensible à la tétracycline du pTet-Splice, TetP. Le niveau basal élevé observé dans ce dernier cas peut être dû à la trop grande proximité des deux promoteurs entraînant un encombrement stérique [219] ou au fait que l'ARN antisens ne possède pas dans ce cas de signal de polyadénylation : il y a sans doute un problème de co-localisation des deux ARN [289].

Un inconvénient mérite d'être noté : dans ce cas le ratio sens/ antisens ne peut pas être contrôlé voire modifié. Un fort niveau basal est par exemple observé dans le cas du plasmide pGJA15-2 et la quantité d'antisens ne peut être modifiée.

Ce protocole reste cependant plus efficace car il ne nécessite que la co-transfection de deux plasmides au lieu de trois. Idéalement il faudrait construire un seul plasmide portant l'ensemble des constructions constituant le système de régulation. Un tel système serait particulièrement intéressant pour la génération de souris knock-out ou knock-in : les méthodes actuelles pour générer des souris transgéniques avec un tel système nécessitent la plupart du temps la génération de deux lignées transgéniques, l'une portant le transgène d'intérêt sous contrôle de l'opérateur tetO et l'autre portant le transgène rtTA. En croisant les lignées on obtient des descendants avec les deux transgènes permettant la régulation du gène d'intérêt par l'administration de tétracycline. Cette technique de croisement prend beaucoup de temps pour la sélection et l'analyse des animaux transgéniques. Si l'ensemble du système est sur le même vecteur, une seule lignée de souris est nécessaire, d'où un gain de temps [219].

2.6.4 Régulation à long terme de l'expression de l'Epo *in vivo*

Au vu des résultats obtenus avec la hSeAP nous avons décidé de tester l'efficacité de ce même système à trois plasmides avec le gène de l'érythropoïétine de souris, couramment utilisé dans un tel but (on peut citer par exemple [216]). Pour toutes les expériences *in vivo* réalisées par la suite nous avons remplacé les souris SCID immunodéficientes par des souris C57Bl/6 ou SWISS immuno-compétentes car il s'agit de l'érythropoïétine de souris.

Première évaluation : comparaison de différents rapports sens/antisens

La fonctionnalité du système Tet-Off appliqué dans une stratégie antisens sur le gène de l'érythropoïétine a été démontrée *in vitro* (figure 2.12).

Le même système est donc étudié *in vivo* par injection intramusculaire et électrotransfert dans le muscle tibial cranial de souris C57Bl/56 femelles adultes. Jusqu'à présent, pour les expériences utilisant la hSeAP, des quantités équivalentes de plasmide sens et antisens étaient utilisées. Dans le cas du gène de l'érythropoïétine, la moindre variation d'Epo induit de façon très sensible une variation de l'hématocrite. Nous testons donc dans une première expérience deux rapports de plasmide sens/plasmide antisens. Un premier groupe de souris (groupe contrôle) est injecté et électrotransféré uniquement avec le plasmide pXL3348 codant l'Epo. Deux autres groupes (groupes 1 et 1+) sont traités par co-injection et électrotransfert des plasmides pXL3348, pTet-EpoAS et pTet-tTAK en quantités égales, alors que deux autres groupes (groupe 2 et 2+) sont traités avec les plasmides pXL3348 et 5 fois plus de plasmide pTet-EpoAS et pTet-tTAK. Enfin

un dernier groupe (groupe naïf) ne reçoit aucun traitement. Les lots 1+ et 2+ reçoivent de la doxycycline pendant les 7 premiers jours de la cinétique à raison de 400mg/l dans 5% sucrose.

Ces souris, excepté le lot naïf, sont injectées en intramusculaire avec 3 μ g de plasmide pXL3348, et différentes quantités de plasmide antisens correspondant. Cette valeur de 3 μ g a été choisie suite à une étude précédente donnant la quantité d'EPO dosée dans le sérum en fonction de la quantité de plasmide codant l'érythropoïétine de souris injectée [146]. La quantité d'ADN plasmidique totale injectée est dans tous les cas de 33 μ g.

La variation de l'hématocrite de ces souris a été suivie en fonction du temps par prélèvement du sang directement dans un microcapillaire hépariné après centrifugation. En effet l'érythropoïétine permet d'augmenter la production de globules rouges dans le sang; la mesure de l'hématocrite est donc une mesure de l'effet physiologique de la présence d'Epo dans l'organisme.

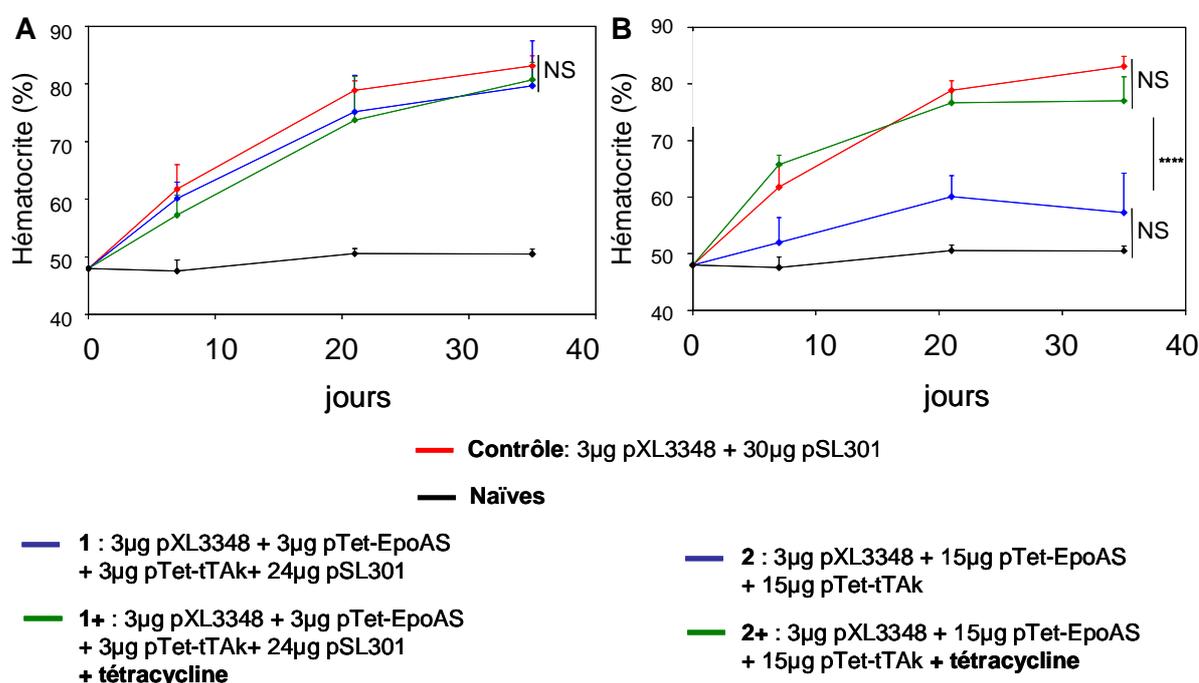


FIG. 2.18 – *Mesure de l'hématocrite pour une première évaluation du système de régulation de l'Epo à trois plasmides.* Les souris C57Bl/6 (9 souris par groupe) sont co-injectées et électrotransférées dans le muscle tibial cranial. Les 9 souris des groupes 1+ et 2+ ont reçu de la doxycycline dans leur boisson pendant les 7 premiers jours de la cinétique à une concentration finale de 400 mg/l avec 5% sucrose. Des échantillons de sang ont été prélevés régulièrement aux temps indiqués (axe des abscisses) et la mesure de l'hématocrite est effectuée directement à partir du prélèvement (voir Matériel et Méthodes). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD des 9 souris pour chaque groupe. Notations des statistiques (test ANOVA) : différence significative avec **** $p < 0,0001$, NS : non significatif.

L'hématocrite standard des animaux non traités est d'environ 48% tout au long de la cinétique. L'hématocrite du lot contrôle, dans lequel le gène de l'érythropoïétine sous contrôle du promoteur CMV est exprimé de façon constitutive, augmente au cours du temps pour se stabiliser vers 83%. La même quantité de plasmide sens et antisens a été injectée dans les lots 1 et 1+, la seule différence étant la présence ou non de doxycycline dans leur boisson. L'hématocrite augmente dans les deux lots sans distinction notable avec ou sans doxycycline, pour atteindre le même niveau que le lot contrôle (figure 2.18 A). Le système de régulation ne fonctionne pas

dans ce cas là, ceci montre une faiblesse de notre système.

Par contre dans les lots 2 et 2+ (figure 2.18 B) pour lesquels on a injecté cinq fois plus de plasmide antisens, on observe une différence très nette. Les souris du lot 2+, qui ont eu de la doxycycline dans leur boisson pendant les sept premiers jours de la cinétique et donc qui, pendant les sept premiers jours de la cinétique n'ont pas transcrit d'ARN Epo antisens, ont un hémocrite globalement semblable à celui du lot contrôle tout au long de la cinétique. Au contraire les souris du lot 2, qui n'ont jamais eu de doxycycline et donc qui depuis le début transcrivent l'ARN Epo antisens, ont un hémocrite assez faible autour de 55% tout au long de la cinétique, légèrement supérieur tout de même à l'hémocrite des souris naïves. Cette augmentation de l'hémocrite par rapport à l'hémocrite normal peut être due à un problème d'absence de co-localisation et de pénétration des différents plasmides (déjà observé *in vitro*). Si quelques cellules musculaires ont internalisé uniquement le plasmide pXL3348 et seulement le plasmide antisens ou le pTet-tTAK mais pas les deux, on aura production d'érythropoïétine et donc augmentation de l'hémocrite.

Dosage ELISA de l'érythropoïétine dans le sérum

Nous avons ensuite réalisé un dosage ELISA de l'érythropoïétine de souris dans le sérum prélevé aux mêmes temps que la figure 2.18 pour confirmer ces résultats et pour avoir directement la mesure de la protéine dont nous régulons l'expression. Nous n'avons dosé que les sérums des souris du lot contrôle, 2, 2+ et naïves. Nous avons regroupé les sérums des souris d'un même lot, et dosé ce sérum en triplicata, car nous disposions de quantités insuffisantes de sérum. En effet, pour un hémocrite de 80%, seul 20% du volume de l'échantillon est exploitable.

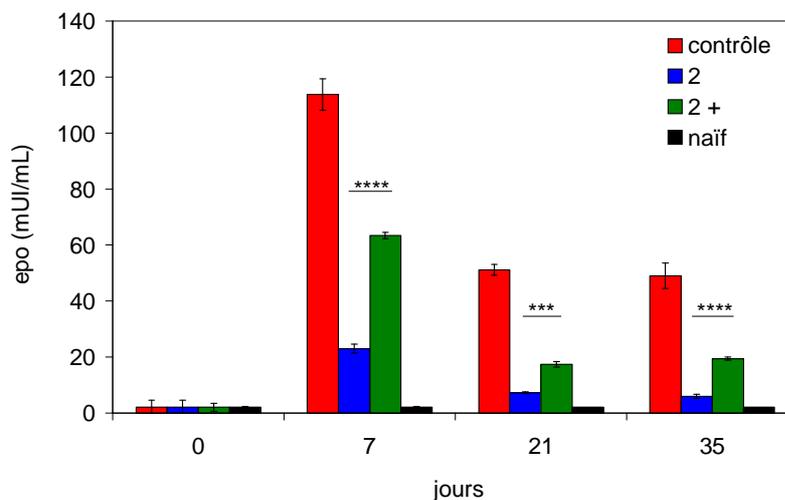


FIG. 2.19 – *Dosage de l'Epo dans le sérum de souris C57Bl/6 après injection et électrotransfert du système complet.* Pour les conditions voir la légende de la figure 2.18. Le dosage de l'Epo est effectué par dosage Elisa (voir Matériel et Méthodes). Les résultats sont exprimés en mUI/ml et correspondent à la moyenne \pm SD de triplicata des sérums rassemblés pour chaque groupe. Notations des statistiques (test ANOVA) : différence significative avec *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Les résultats du dosage nous montrent globalement pour tous les lots un pic d'expression caractéristique de l'électrotransfert à 7 jours. Comme attendu, la quantité d'EPO dans les sérums du lot naïf ne varie pas, avec une valeur moyenne de 2mUI/mL de sérum. Par ailleurs dans les différents lots les quantités d'EPO dans le sérum sont en accord avec l'hémocrite mesuré. On

constate en effet une quantité d'EPO élevée allant jusqu'à 110mUI/mL de sérum dans les souris du lot contrôle, concordant avec l'hématocrite élevé observé (de l'ordre de 80%). On constate également une quantité d'EPO élevée dans le lot 2+ allant jusqu'à 65mUI/mL de sérum alors que les souris du lot 2 ont une quantité d'EPO dans leur sérum beaucoup plus faible ne dépassant pas 25mUI/mL. Ces résultats concordent là encore avec la différence d'hématocrite observée entre le lot 2+ qui a reçu de la doxycycline et le lot 2 qui n'en a jamais eu. On remarque également que l'augmentation observée en hématocrite sur le lot 2 par rapport au lot naïf est due à une quantité d'Epo très faiblement supérieure, peut-être même uniquement due au pic d'expression à 7 jours.

Cinétique à long terme

Nous avons suivi l'hématocrite des lots contrôle, 2, 2+ et naïf pendant 89 jours. Les souris du lot 2+ ont reçu de la doxycycline uniquement pendant les 7 premiers jours de la cinétique. Curieusement aucune variation d'hématocrite n'est observée au cours du temps. Les globules rouges chez la souris ayant une demi-vie de 24 jours environ [241], même en tenant compte de l'inertie engendrée par la mise en route du système de production de globules rouges par l'Epo, 89 jours après injection et électrotransfert une baisse de l'hématocrite dans le lot 2+ aurait dû être observée, puisque la transcription d'ARN Epo antisens est normalement rétablie depuis l'arrêt de la doxycycline. Nous avons peut-être injecté une trop grande quantité de plasmide pXL3348 codant l'érythropoïétine ce qui entraînerait une augmentation d'hématocrite importante dans le lot 2+ et non réversible par l'antisens pTet-EpoAS. Il se peut également que la quantité de plasmide antisens soit trop faible par rapport à la quantité de plasmide sens injectée, l'ARN antisens ne parvient pas à éteindre suffisamment l'expression du gène Epo. Par ailleurs nous avons tenté d'induire une augmentation d'hématocrite dans le lot 2 en rajoutant de la doxycycline à J89 pendant deux jours. Mais aucune augmentation d'hématocrite n'a été observée. Le système semble être verrouillé, il ne fonctionne pas comme précédemment avec le gène de la hSeAP.

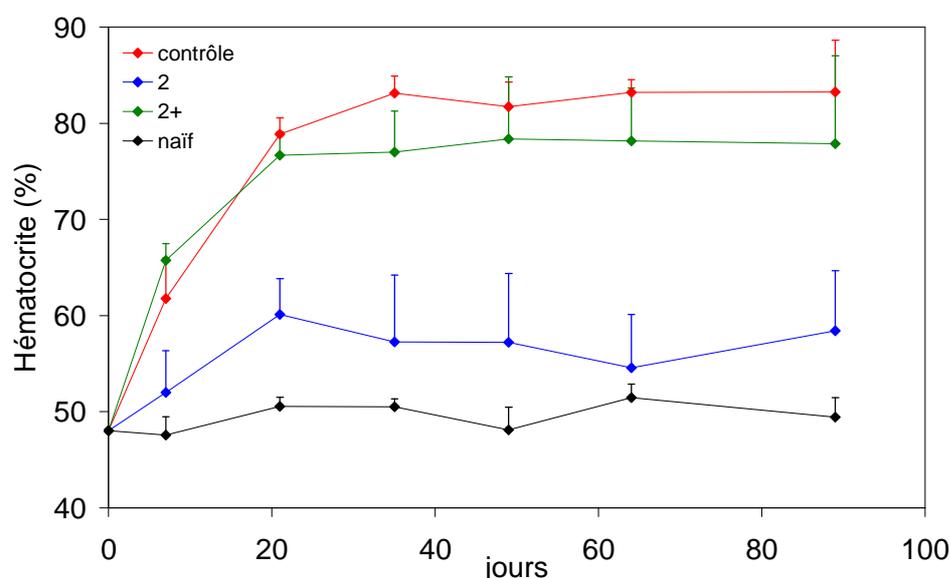


FIG. 2.20 – *Cinétique à long terme de l'hématocrite.* Pour les conditions voir la légende de la figure 2.18. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD des souris de chaque groupe.

Deuxième évaluation

Au vu des résultats de la cinétique précédente et des hypothèses formulées, une nouvelle cinétique est réalisée. $1\mu\text{g}$ de plasmide pXL3348 au lieu de trois est injecté dans le but d'avoir une baisse de l'hématocrite plus rapide dans le lot avec doxycycline. D'autre part, sept fois plus de plasmide antisens sont injectés, en espérant ainsi verrouiller de façon plus stricte le système et ainsi éviter l'augmentation d'hématocrite du lot sans doxycycline. L'expérience est réalisée sur 40 souris réparties en 4 lots de 10 souris avec toujours un lot contrôle (pXL3348 seul), un lot naïf (aucun traitement) et deux lots injectés et électrotransférés avec le plasmide pXL3348 et sept fois plus de plasmides pTet-EpoAS et pTet-tTAK. Dans ces deux lots, l'un a reçu de la doxycycline à une concentration de 400mg/l pendant les 4 premiers jours de la cinétique (lot «système complet + DOX»), l'autre non (lot «système complet»). L'hématocrite des souris est suivi au cours du temps. La figure 2.21 nous permet de comparer en parallèle la première et la deuxième cinétique.

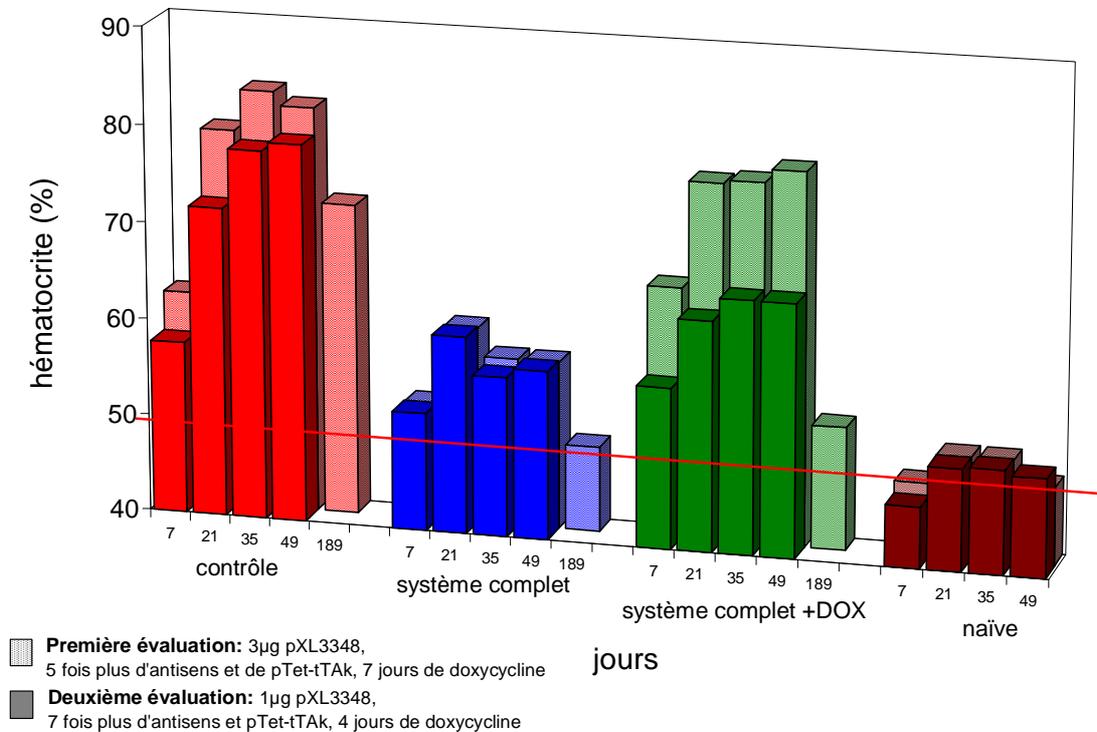


FIG. 2.21 – Comparaison des deux cinétiques de l'hématocrite de souris C57Bl/6 après électrotransfert de différentes constructions plasmidiques. Les valeurs correspondent aux moyennes des hématocrites des souris de chaque groupe.

On confirme tout d'abord que l'hématocrite des souris naïves est fixe vers 48%. L'hématocrite des souris du lot contrôle de la deuxième cinétique est globalement plus bas que celui de la première cinétique ce qui est normal puisqu'on a cette fois injecté $1\mu\text{g}$ de plasmide codant l'érythropoïétine au lieu de 3. L'hématocrite des souris du lot sans doxycycline est exactement le même que celui des souris du lot sans doxycycline de la première expérience correspondant. Les souris du lot + Dox qui ont eu de la doxycycline pendant les 4 premiers jours de la cinétique ont un hématocrite également bien inférieur à celui des souris du lot correspondant de la première cinétique. L'induction est du coup beaucoup moins forte : au bout de 35 jours on constate une

différence d'hématocrite de 10% uniquement entre les lots avec ou sans doxycycline alors que dans la première cinétique on avait une différence au même temps de 20%. Cependant cette induction plus faible n'est pas forcément gênante dans le cadre d'applications cliniques de thérapie génique. Ce qui importe c'est la présence d'une induction et un niveau basal sans induction faible. Or sur cette deuxième condition on observe que l'hématocrite du lot sans induction est exactement le même que celui du lot correspondant dans la première cinétique, et supérieur à l'hématocrite normal des souris. Une plus grande quantité de plasmide codant l'Epo antisens n'a pas permis de verrouiller le système, on a toujours la même augmentation d'hématocrite.

De plus nous ne parvenons toujours pas à éteindre l'induction même après 49 jours. Une mesure à 190 jours après traitement nous redonne un niveau basal dans le lot traité (figure 2.21 à 189 jours) mais ce temps est beaucoup plus long que le temps d'inertie du système.

Troisième évaluation

Pour tenter de comprendre le problème nous réalisons un nouvel essai, dans les mêmes conditions que la première expérience (sauf que l'on travaille cette fois sur des souris SWISS) : un rapport 1/5 de plasmide sens/antisens, une quantité de plasmide pXL3348 de $3\mu\text{g}$ et une induction pendant 7 jours à la doxycycline. Le but de cette troisième évaluation était de confirmer les résultats obtenus dans le premier essai, en essayant par ailleurs d'induire une augmentation de l'expression dans le lot sans doxycycline en ajoutant de la doxycycline pendant plus longtemps, trois semaines après le début du traitement. Dans le but de pouvoir comparer au mieux les différents lots, nous avons changé le lot contrôle dans cette expérience : au lieu de compléter à $33\mu\text{g}$ avec le plasmide vide pTet-Splice, nous complétons avec $15\mu\text{g}$ de plasmide pTet-tTAK et $15\mu\text{g}$ de plasmide pTet-Splice pour se rapprocher encore des lots testés.

Cette troisième évaluation n'a pas fonctionné comme nous le souhaitions : tous les lots ont eu un hématocrite élevé très rapidement. Par contre le lot contrôle de cette expérience nous a permis de mettre en évidence un problème dans notre système : en effet au lieu de mesurer un hématocrite croissant dans ce lot au cours du temps comme précédemment (figure 2.22 A, lot pXL3348), dès 35 jours l'hématocrite retombe quasiment au niveau basal (figure 2.22 A, lot pXL3348+pTet-tTAK). Les seules différences entre ces deux lots sont la présence ou non du plasmide pTet-tTAK et la souche de la souris. Cette chute d'hématocrite brutale pourrait s'expliquer par une réaction immunitaire contre la protéine de fusion activatrice de transcription tTA.

Pour vérifier s'il s'agit d'une réaction immunitaire contre la protéine activatrice de transcription tTA rajoutée dans ce lot et non contre l'érythropoïétine elle-même, nous avons réinjecté le plasmide pXL3348 seul dans la même patte des souris du lot contrôle 62 jours après le début de la cinétique. On constate alors une nouvelle augmentation à nouveau de l'hématocrite dans la plupart des souris (figure 2.22 B).

Par ailleurs pour confirmer ce résultat et pour nous affranchir d'un effet dû à la souche de souris utilisée (précédemment C57Bl/6, ici SWISS) nous avons injecté et électrotransféré 18 souris SWISS avec soit le plasmide pXL3348 seul, soit le plasmide pXL3348 + pTet-tTAK sans doxycycline, soit le plasmide pXL3348 + pTet-tTAK + Doxycycline. En effet, le gène tTA est sous contrôle lui aussi du promoteur TetP inductible à la tétracycline. En absence de tétracycline, la protéine tTA se lie sur l'élément de réponse en amont du promoteur et active sa propre transcription. Dans le lot traité à la doxycycline, la réaction immunitaire devrait être plus tardive.

Effectivement on observe (figure 2.23) un hématocrite croissant dans le lot traité uniquement avec le plasmide pXL3348, et un taux d'hématocrite qui chute dès 21 jours dans les deux autres lots (plasmide pXL3348 + pTet-tTAK) avec une différence significative entre le lot traité à la

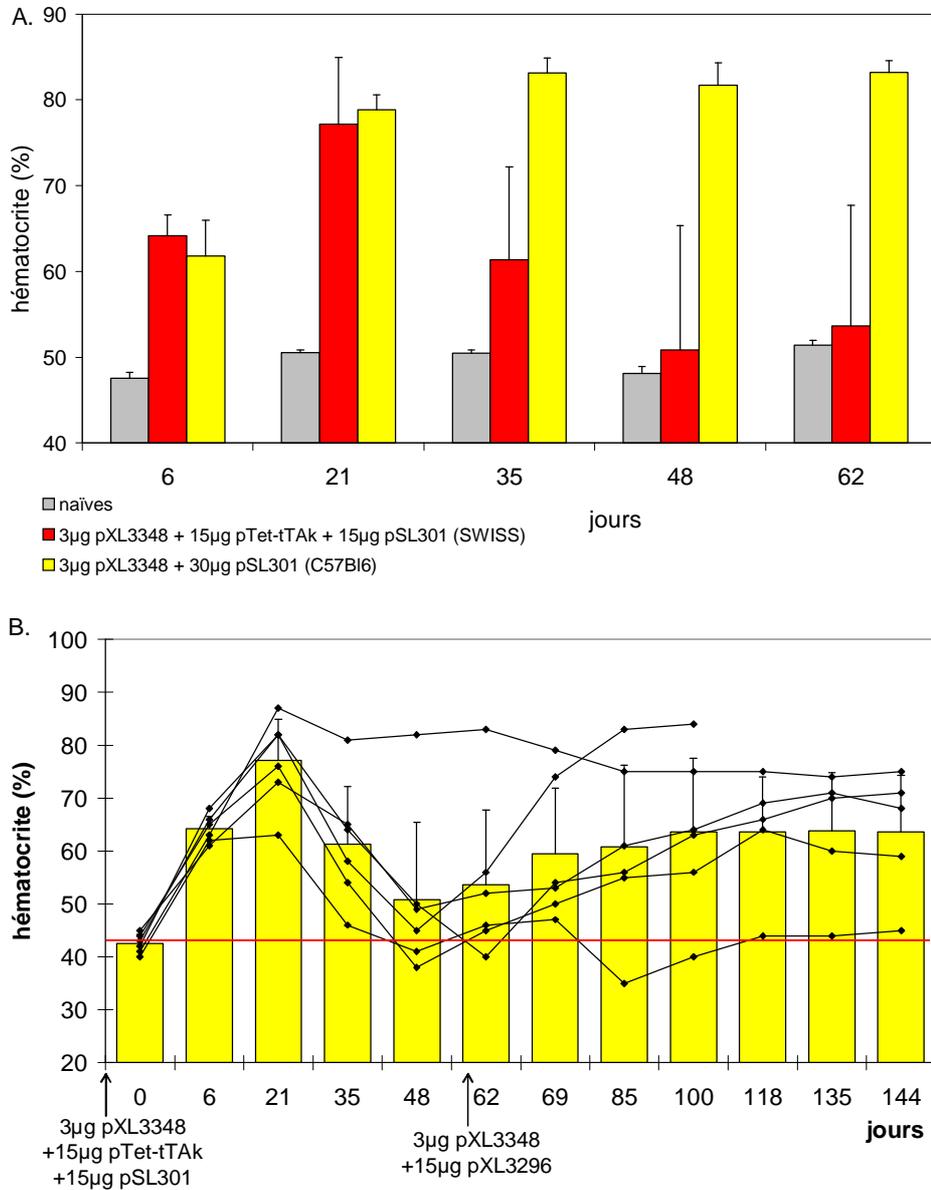


FIG. 2.22 – *Variations de l'hématocrite dans les lots contrôles.* A. Comparaison de l'hématocrite des lots contrôles de la première évaluation et de la dernière évaluation. B. Suivi de l'hématocrite du lot contrôlé de la dernière évaluation après électrotransfert à J0 et J62. L'hématocrite des souris individuelles est aussi indiqué (traits noirs). Des échantillons de sang ont été prélevés régulièrement aux temps indiqués (axe des abscisses) et la mesure de l'hématocrite est effectuée directement à partir du prélèvement. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD des souris pour chaque groupe.

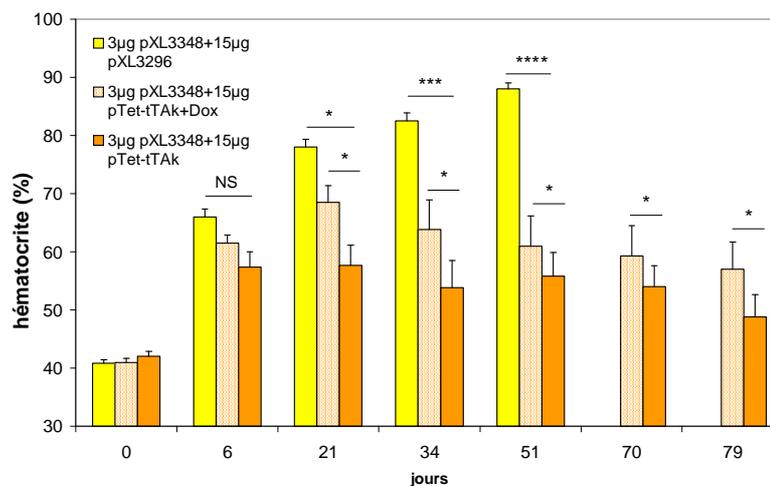


FIG. 2.23 – *Variation de l'hématocrite dans 3 groupes de souris co-injectées ou non avec le plasmide pTet-tTAK.* Des échantillons de sang ont été prélevés régulièrement aux temps indiqués (axe des abscisses) et la mesure de l'hématocrite est effectuée directement à partir du prélèvement. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM des souris pour chaque groupe. Les souris du lot +Dox ont reçu de la doxycycline dans leur boisson pendant les 15 premiers jours de la cinétique à une concentration finale de 400 mg/l avec 5% sucrose. Notations des statistiques (test ANOVA) : différence significative avec * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, NS : non significatif.

doxycycline et le lot sans. A 51 jours nous avons sacrifié les souris du lot traité avec le pXL3348 car elles avaient un hématocrite trop élevé (environ 90%). A 79 jours, l'hématocrite des souris traitées avec les plasmides pXL3348 et pTet-tTAK sans doxycycline est quasiment retombé au niveau de départ (souris non traitées). Il semble donc bien que l'expression de la protéine activatrice de transcription tTA induise une réaction immune chez les souris SWISS. Ceci permettrait d'expliquer en partie le mauvais fonctionnement de notre système de régulation sur des souris immunocompétentes.

L'activateur de transcription eucaryote sensible à la tétracycline tTA résulte de la fusion du répresseur tetR de l'opéron du gène de résistance à la tétracycline d'*Escherichia coli*, Tn10, et d'une protéine du virus de l'herpès, VP16, qui possède un domaine d'activation de transcription. La nature même de cet activateur de transcription peut donc laisser présager une possible réponse immune. De nombreuses études ont montré une régulation efficace et à long terme de l'érythropoïétine avec un système Tet sans réaction immune chez la souris et le primate [216,241]. Cependant d'autres études récentes semblent montrer la possibilité d'une réponse immunitaire : on peut citer par exemple deux études chez le primate, l'une observant une réaction immune contre la protéine rtTA2^S-M2 après injection et électrotransfert du plasmide correspondant [297], l'autre contre la protéine rtTA après injection intramusculaire d'un AAV recombinant [298]. Chez la souris, une étude a également montré une réaction immune contre le rtTA après injection du plasmide correspondant formulé avec un vecteur chimique et injecté dans le muscle. Dans cette étude cependant, la réaction immune apparaît après plusieurs inductions [299]. Dans une étude récente, il a été observé une réponse immune chez la souris contre le transactivateur rtTA2^S-M2 en utilisant un adénovirus injecté dans le muscle [300]. Cette réponse immune semble pouvoir être évitée en diminuant les doses d'ADNc codant le transactivateur. Il faut noter que dans la plupart des études pour lesquelles aucune réaction immune n'a été détectée, les quantités d'ADNc codant

le transactivateur sont bien inférieures aux quantités que nous avons injecté dans notre étude (entre 0,5 et 5 μ g comparés à nos 15 μ g). Nous avons tout au long de l'étude conservé une quantité égale de plasmide pTet-tTAK et de plasmide antisens. Il serait intéressant d'étudier le système en faisant varier ces quantités de plasmide injectées. Il n'est en effet peut-être pas nécessaire d'avoir autant de plasmide pTet-tTAK que de plasmide antisens. De plus l'électrotransfert induit une inflammation locale qui favorise une possible réaction immunitaire.

2.6.5 Remarque : étude de l'effet d'un ARN double brin dans une cellule

Au cours de cette étude, pour tenter de comprendre plus précisément les problèmes de ce système de régulation, nous sommes revenus sur une étude *in vitro* pour vérifier l'effet d'un double brin d'ARN dans une cellule et plus particulièrement l'effet sur la transcription. En effet de nombreuses publications et plus particulièrement, la plupart des introductions sur les ARN interférents, semblent montrer qu'un long double brin d'ARN dans une cellule induit une réponse interféron.

Nous avons pour cela réalisé plusieurs co-transfections sur des cellules B16 avec :

- le plasmide pXL3010 (hSeAP) combiné avec les plasmides pXL3031 et pLucAS (formation d'un double brin d'ARN Luc)
- le plasmide pXL3010 combiné avec les plasmides pXL3348, pTet-EPOAS et pTet-tTAK (formation d'un double brin d'ARN Epo en absence de tétracycline)
- le plasmide pXL3031 (luc+) combinés avec les plasmides pXL3010 et pSeAPAS (formation d'un double brin d'ARN SeAP)
- le plasmide pXL3031 combiné avec les plasmides pXL3348, pTet-EPOAS et pTet-tTAK (formation d'un double brin d'ARN Epo en absence de tétracycline)

Nous observons que l'expression de la hSeAP est inhibée en présence d'un double brin d'ARN Luc et inversement l'expression de la Luc est inhibée en présence d'un double brin d'ARN SeAP. Comme montré précédemment, un ARN antisens Luc n'inhibe pas l'expression de la hSeAP et réciproquement (voir figure 2.7). L'ARN double brin a donc bien un effet sur la traduction. Cette observation est également retrouvée avec un double brin d'ARN Epo dont la formation est contrôlée par la tétracycline : en absence de tétracycline, l'ARN double brin se forme et on observe une inhibition forte ; en présence de tétracycline, l'ARN double brin ne se forme pas et on observe une inhibition moins forte.

Nous n'avons pas pu pour l'instant aller plus loin dans cette étude. Il faudrait étudier plus précisément l'effet de cet ARN double brin en étudiant un possible effet apoptotique sur des cellules. On peut citer quelques études qui suggèrent un tel problème : Zhang et al. ont observé dans leurs cellules exprimant un antisens dirigé contre une télomérase humaine, une sensibilité accrue à l'apoptose avec une possible interaction avec p53 [287]. Ils suggèrent que l'antisens peut avoir un rôle sur des composants cellulaires tels que des facteurs de transcription par exemple. Récemment Tran et al. ont utilisé un ARN double brin contre la GFP dans des lignées stables GFP et ont observé une diminution de l'expression de la GFP qu'ils n'observent pas avec l'antisens seul. Deux voies principales sont en général décrites comme étant activées par la présence d'un long double brin d'ADN dans ces cellules : la voie de l'interféron alpha qui mène à l'activation de la protéine PKR (dsRNA-dependent protein kinase). Cette protéine kinase activée phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2D entraînant une inhibition généralisée de la traduction et la mort cellulaire par apoptose. La seconde voie est l'activation de la synthétase 2,5,oligoadénylate qui synthétise l'acide 2,5, polyadénylique qui mène à l'activation de la RNase L, celle-ci ciblant de manière non spécifique tous les ARNm. Tran et al. ont étudié en détail les mécanismes possibles de cette diminution de l'expression mais elle ne semble pas faire intervenir

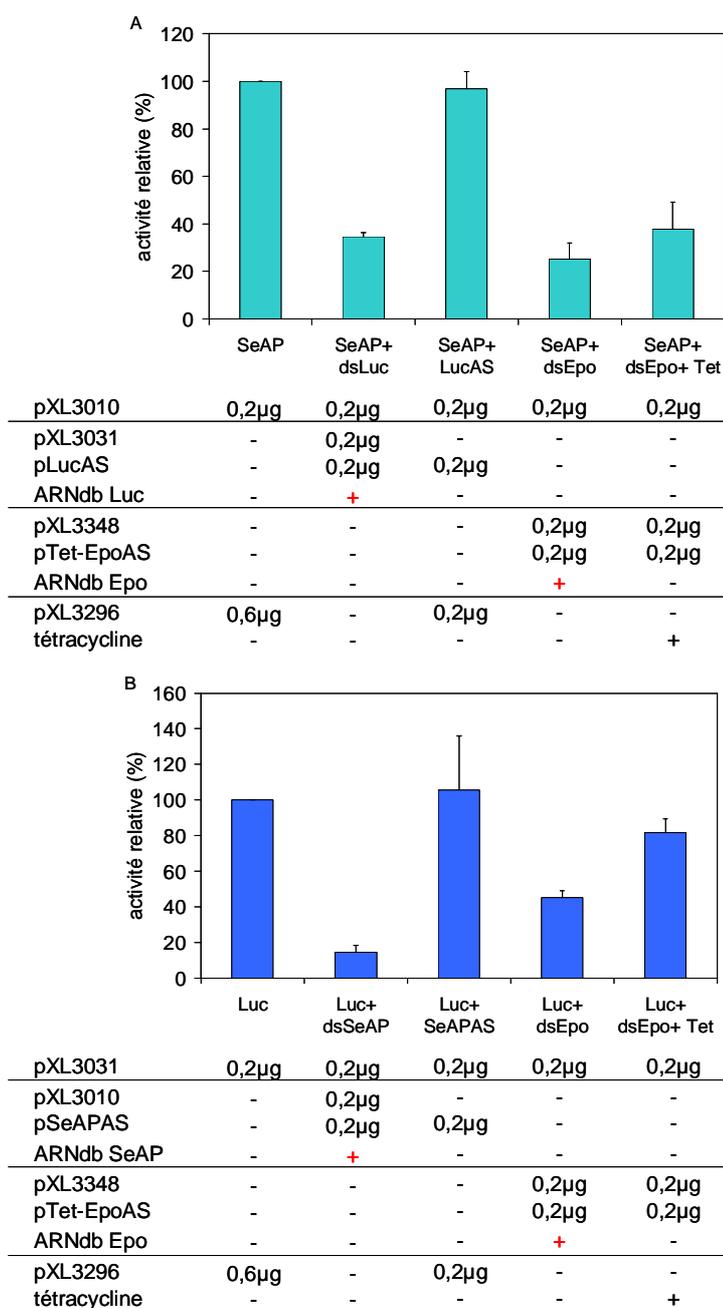


FIG. 2.24 – *Effet d'un double brin d'ARN sur la transcription.* Les co-transfections sont réalisées en plaque 24 puits sur des cellules B16 avec 4 nmoles RPR209120/µg d'ADN. Les dosages sont effectués 48h après transfection dans le surnageant de culture pour la hSeAP (A) et dans le lysat cellulaire pour la luc+ (B). Les résultats correspondent à la moyenne ± sem de deux expériences similaires avec chaque condition réalisée en triplicata et sont exprimés en pourcentage de l'expression du gène rapporteur seul. Dans les conditions avec tétracycline, la tétracycline est ajoutée à une concentration finale de 1µg/ml.

la protéine PKR ni le mécanisme d'ARN interférence [301].

Il faudra donc étudier plus en détail l'effet d'un long double brin d'ARN dans une cellule mais dans notre cas, il n'est pas possible de conclure sur cet aspect.

2.7 Conclusions et Perspectives

Nous avons ainsi montré qu'il était possible de réguler de façon efficace et pendant plus d'un an l'expression du gène de la phosphatase alcaline humaine sécrétée sur des souris SCID. Cette régulation s'est avérée plus efficace si les composants du système de régulation se trouvaient sur le même plasmide, résultant probablement d'une meilleure co-localisation des plasmides constituant le système.

Les résultats de la régulation du gène de l'érythropoïétine sur des souris immunocompétentes ne sont pas très positifs. L'inhibition de l'expression par un antisens est possible au début de l'étude mais le système semble se bloquer par la suite. Le principal problème observé au cours de cette étude est la réaction immune contre le transactivateur tTA. Cette réaction est très certainement due à la grande quantité de plasmide injecté combinée à l'utilisation de la technique de l'électrotransfert et de souris immunocompétentes. Le tableau 2.2 résume les différents cas possibles pour les cellules musculaires transfectées après co-injection et électrotransfert des trois plasmides. Si l'on considère que les cellules induisant une réaction immune seront détruites par la suite, on comprend que le système n'est pas pu être induit à nouveau.

Plasmides transfectés	- Tétracycline	+ Tétracycline
sens	Epo	Epo
antisens	⊙	⊙
pTet-tTAK	réaction immune	⊙
sens + antisens	Epo	Epo
sens + pTet-tTAK	réaction immune	Epo
antisens + pTet-tTAK	réaction immune	⊙
sens + antisens + pTet-tTAK	réaction immune + ARNdb	Epo

TAB. 2.2 – *Schéma explicatif pour le système de régulation de l'Epo.*

Il serait intéressant de tester d'autres quantités de plasmide : en injectant moins de plasmide pXL3348 on pourrait ainsi réduire les quantités de plasmide antisens et de plasmide pTet-tTAK, ou même étudier des quantités différentes de plasmide antisens et pTet-tTAK.

Depuis cette étude, d'autres systèmes de régulation ont été développés montrant une grande efficacité : on peut citer par exemple Lamartina et al. qui ont utilisé la combinaison du répresseur tTS et de la dernière version du transactivateur du Tet-On, le rtTA2^S-M2, ces deux éléments étant placés sur un vecteur biscistronique [252]. Nous avons donc décidé d'arrêter à ce stade l'étude de notre système de régulation.

Obtention d'antisérums antitoxines botuliques

Sommaire

3.1	Les toxines botuliques	123
3.2	Procédés d'obtentions d'antisérums anti-BoNT	128
3.3	Fragment immunogène	129
3.4	Mécanisme de l'immunisation par ADN	130
3.5	Description du projet	133
3.6	Première évaluation : antisérums anti-BoNTA	134
3.7	Optimisation du fragment immunogène	138
3.8	Optimisation du protocole	147
3.9	Caractérisation des antisérums	155
3.10	Antisérums anti-BoNTB et anti-BoNTE	158
3.11	Sérums multivalents	160
3.12	Application de la technique au lapin	163
3.13	Conclusion et Perspectives	165

Le but de ce projet est d'examiner le potentiel de l'électrotransfert d'ADN plasmidique pour l'obtention d'anticorps neutralisants à haut titre, à usage thérapeutique, contre les toxines botuliques A, B et E.

Dans un premier temps nous décrirons succinctement les toxines botuliques et le mécanisme par lequel ces toxines bloquent la transmission neuromusculaire.

3.1 Les toxines botuliques

Les toxines botuliques (et tétanique) sont des substances protéiques produites et sécrétées par des bactéries anaérobies du genre *Clostridium*. Il existe sept types antigéniques de toxines botuliques désignés par des lettres de A à G. A cette classification correspondent des mécanismes cellulaires différents. *Clostridium botulinum* forme un groupe hétérogène de germes anaérobies à Gram positif, présents dans le sol et les milieux marins. Lors de l'infection d'une plaie (tétanos) ou d'absorption de nourriture contaminée (botulisme), les toxines sécrétées sont capables d'induire la mort par paralysie spasmodique (tétanos) ou flasque (botulisme) chez la plupart des espèces du règne animal. Ce sont des protéines de 150 kDa qui inhibent à des doses infimes (de l'ordre

du pg/kg) la libération des neurotransmetteurs au niveau du système nerveux central (tétanos) ou au niveau des motoneurones (botulisme).

3.1.1 Organisation fonctionnelle

Les différents types de toxines botuliques possèdent une même structure. Elles sont synthétisées sous forme d'une seule chaîne protéique de 150 kDa qui est peu active. Ce précurseur est ensuite activé par un clivage protéolytique grâce à des protéases soit produites par *C.botulinum*, soit d'origine digestive telle la trypsine. Ce clivage détermine ainsi deux chaînes protéiques : la chaîne légère (L) en N-terminal de 50 kDa et la chaîne lourde (H) en C-terminal de 100 kDa, qui restent réunies par un pont disulfure (figure 3.1).

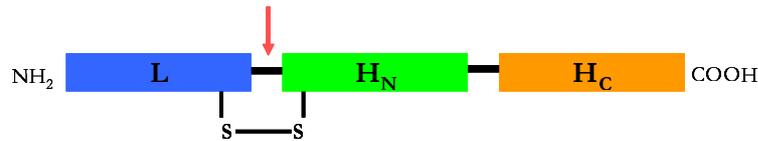


FIG. 3.1 – structure

Trois domaines fonctionnels ont été définis sur ces neurotoxines, chacun étant associé à une structure tridimensionnelle particulière (figure 3.2). Le domaine C-terminal de la chaîne lourde contient deux structures riches en feuillettes bêta, le domaine N-terminal de la chaîne lourde est formé de deux très longues hélices alpha, et la chaîne légère forme une structure compacte riche en feuillettes bêta (figure 3.2) [302–305].

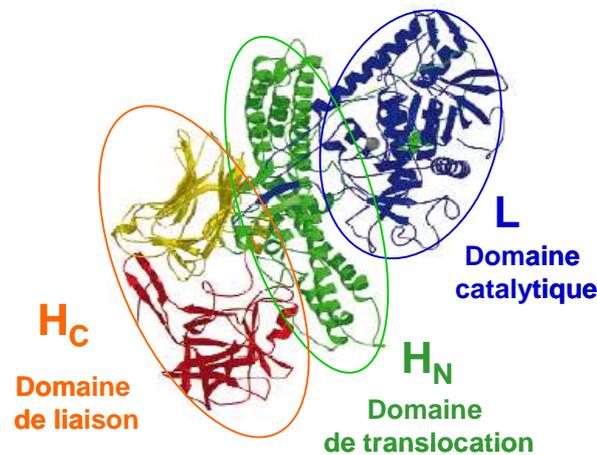


FIG. 3.2 – Structure et domaines fonctionnels de la toxine botulique A. D'après [305]

L'ensemble des gènes des neurotoxines botuliques et tétaniques a été séquencé et la structure cristallographique a été déterminée pour les neurotoxines botuliques A et B et la neurotoxine tétanique.

3.1.2 Mécanisme d'action

La neurotoxine botulique, qu'elle soit ingérée directement ou produite au niveau de l'intestin ou d'une blessure, pénètre dans la circulation sanguine et est transportée jusqu'aux terminaisons

nerveuses périphériques cholinergiques (figure 3.3).

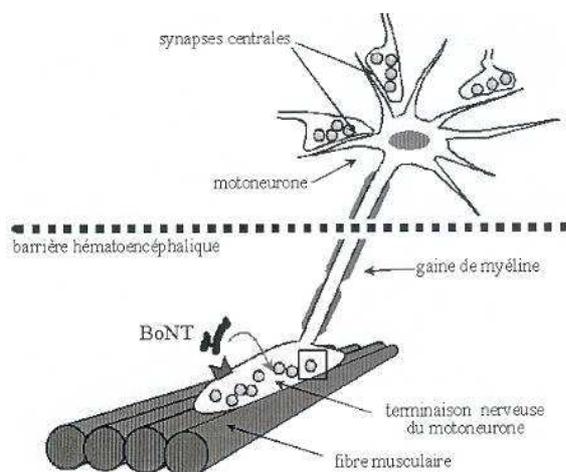


FIG. 3.3 – *Cible des toxines botuliques : les terminaisons des motoneurones.*

Rappelons brièvement que le transfert d'informations entre un motoneurone et une fibre musculaire qui doit se contracter se fait au niveau de contacts appelés synapses. Le principal mode de communication synaptique implique la synthèse par les cellules nerveuses de neurotransmetteurs qui sont ensuite accumulés dans des vésicules synaptiques. La libération de ces neurotransmetteurs par les terminaisons nerveuses du neurone présynaptique est ensuite détectée par la cellule réceptrice, dite postsynaptique. L'acétylcholine est le neurotransmetteur libéré à la jonction entre les nerfs moteurs et les muscles striés squelettiques. La libération de l'acétylcholine se fait en réponse à un influx nerveux qui se traduit par une entrée de Ca^{2+} au niveau de l'extrémité nerveuse. Les vésicules synaptiques fusionnent alors avec la membrane présynaptique et libèrent le neurotransmetteur dans la fente synaptique. Ce dernier transmet le signal commandant la contraction musculaire (figure 3.4 A.).

Les toxines botuliques sont définies comme des neurotoxines du fait de leur action restreinte au seul système nerveux alors que les autres toxines (botulinolysine, toxine C2, exoenzyme C3 par exemple) produites par *Clostridium botulinum* peuvent affecter des types cellulaires divers.

Le mode d'action des neurotoxines botuliques peut être décomposé en quatre grandes étapes faisant intervenir successivement chacun des trois domaines fonctionnels (figure 3.2).

Liaison La première étape est une étape de liaison à des récepteurs localisés sur les régions amyéliniques des terminaisons des motoneurones. Cette étape se fait par la partie C-terminale de la chaîne lourde qui est le domaine de reconnaissance d'un récepteur spécifique à la surface des neurones. Chaque type de toxine botulique reconnaît un récepteur différent. Les récepteurs synaptotagmines I et II ont été identifiés comme étant des récepteurs neuronaux pour les toxines botuliques B et G [306,307]. Les récepteurs pour les autres sérotypes n'ont pas encore été identifiés [308].

Internalisation La deuxième étape est une étape de capture de la neurotoxine par le motoneurone. La moitié N-terminale de la chaîne lourde est impliquée dans l'internalisation dans une vésicule d'endocytose de la toxine entière fixée sur son récepteur.

Translocation L'acidification des vésicules d'endocytose stimule le phénomène de translocation qui consiste en le passage de la chaîne légère à travers la membrane vésiculaire du compartiment de capture (vésicule d'endocytose) vers le milieu intracellulaire (cytosol) de la terminaison du motoneurone.

Blocage neuromusculaire La chaîne légère est le domaine de la toxine botulique qui est actif intracellulairement et qui clive des protéines spécifiques du mécanisme d'exocytose des neuromédiateurs, nommées protéines SNARE (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) attachment protein receptor). La chaîne légère possède dans sa région centrale un motif correspondant au site enzymatique des métalloprotéases dépendantes du zinc. Les toxines botuliques B, D, F et G clivent la protéine VAMP (synaptobrévine) associée aux membranes des vésicules synaptiques, les types A et E clivent la protéine SNAP25 et le type C les protéines syntaxine et SNAP25 qui sont associées à la membrane présynaptique. Ces trois protéines (synaptobrévine, SNAP25 et syntaxine) forment un complexe ternaire qui est impliqué dans l'accostage des vésicules synaptiques près de la membrane présynaptique. Le clivage d'une de ces trois protéines par les toxines botuliques s'accompagne d'un blocage de la libération de neurotransmetteurs. Ainsi les nerfs moteurs intoxiqués par la neurotoxine botulinique ne sont plus capables de stimuler la contraction musculaire en réponse à un influx nerveux (figure 3.4).

3.1.3 Le botulisme

La maladie naturelle, appelée botulisme, résulte le plus souvent de la consommation d'aliments contaminés et se traduit par des paralysies flasques. Il existe trois formes de botulisme : (1) le botulisme d'origine alimentaire, qui survient après l'ingestion d'une toxine botulique présente dans un aliment contaminé, (2) le botulisme par blessure souillée, qui survient à la suite de la croissance de la bactérie dans une blessure contaminée : la toxine est alors libérée dans la circulation sanguine, et (3) le botulisme par colonisation dont la forme la plus connue est le botulisme d'origine infantile, qui survient après l'ingestion de spores.

Les toxines botuliques agissent en bloquant l'excrétion et le relargage de l'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires et ganglionnaires, elles se comportent donc comme un agent paralysant. «Les symptômes apparaissent quelques heures après l'absorption de la toxine. [...] Classiquement le botulisme est caractérisé par des signes oculaires et un tableau de paralysie descendante bilatérale et symétrique sans fièvre.» (tiré de la fiche Afssaps, 2001). La mort peut survenir en raison d'une insuffisance respiratoire.

Le botulisme humain est essentiellement associé aux types A, B et E, et exceptionnellement aux types C et F. Les types C et D sont pathogènes pour les autres mammifères (C pour le cheval, D pour les bovins) et les oiseaux.

3.1.4 Applications thérapeutiques

Les toxines botuliques sont les premières toxines biologiques utilisées comme agent thérapeutique. Comme ces toxines ont un effet spécifique sur les cellules nerveuses, conduisant à une paralysie musculaire sans causer de lésion cellulaire, elles sont utilisées dans le traitement de nombreuses maladies impliquant des désordres musculaires : strabisme (déséquilibre des forces musculaires oculaires), dystonie (contraction involontaire de certains muscles), blépharospasme (contraction des muscles des paupières). Elles sont également utilisées en cosmétique (BOTOXTM) pour paralyser certains muscles faciaux et ainsi réduire significativement les rides.

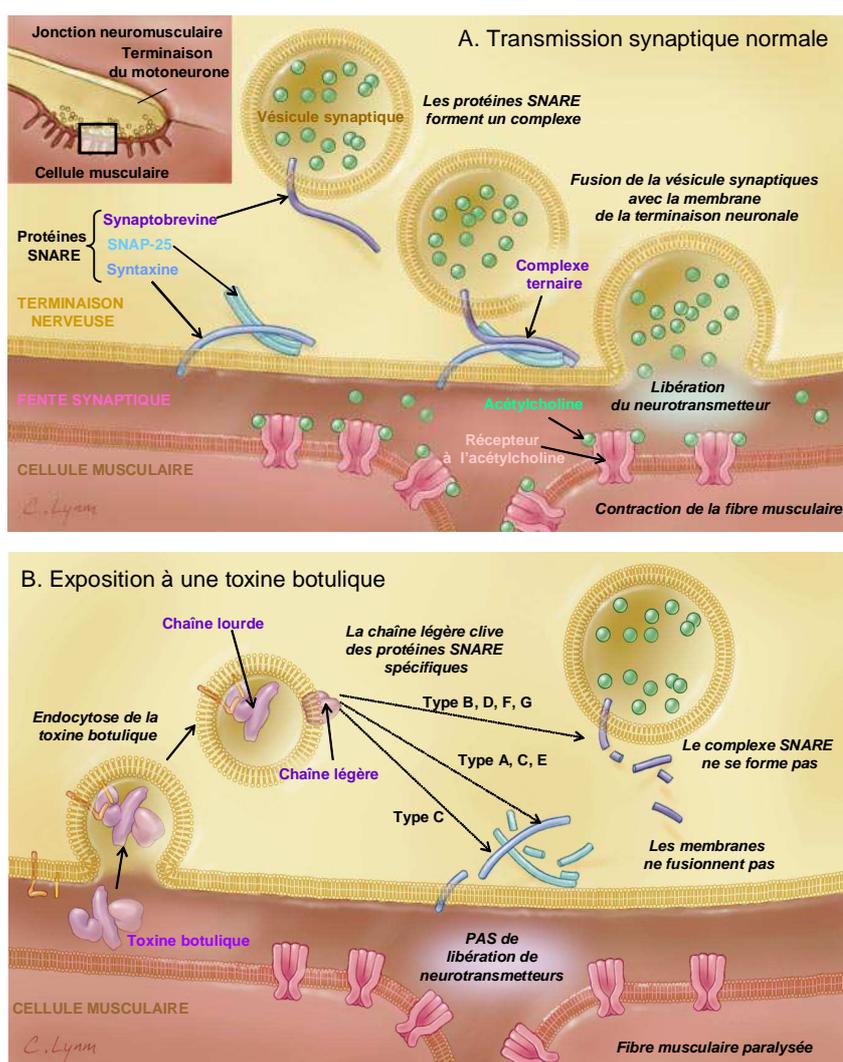


FIG. 3.4 – *Mode d'action des neurotoxines botuliques.* A. Dans un cas normal de transmission neuromusculaire, B. Dans le cas d'une exposition aux neurotoxines botuliques. Schéma réalisé d'après [309]

3.1.5 Bio-terrorisme

D'après la fiche AFSSAPS du 8 novembre 2001, «les toxines botuliques sont les plus puissants poisons actuellement connus.» Les toxines botuliques peuvent être potentiellement utilisées comme arme biologique sous forme d'aérosols.

3.1.6 Stratégies actuelles anti-toxines

Ainsi, bien que le botulisme soit une maladie rare, l'utilisation grandissante de la toxine botulique à des fins thérapeutiques ou cosmétiques et son usage potentiel comme arme justifient qu'on s'emploie à concevoir un antidote efficace. Un cas de botulisme a par exemple été déclaré en Floride suite à un mauvais usage de BOTOXTM (d'après CIDRAP News, 15 décembre 2004).

Différentes stratégies sont actuellement développées pour contrer ces toxines [308] :

- la mise au point d'anticorps neutralisants pour chaque sérotype,

- le développement de petites molécules ou polypeptides inhibiteurs des activités enzymatiques de ces toxines. Un substrat peptidique, le N-Ac-CRATKML-amide, a par exemple été généré pour inhiber l'action de BoNTA : il contient le site de clivage de SNAP25 et des groupements chélateurs du zinc [310]. Des pseudotripeptides synthétiques ont été générés mimant 3 acides aminés du site de clivage et se liant ainsi au site actif de la chaîne légère de BoNTB. Là encore des groupements chélateurs ont été ajoutés pour inhiber l'activité enzymatique [311]. Par criblage à haut débit (HTS) deux composés chimiques (respectivement NSC 625324 et ICD 1578) capables de bloquer l'activité enzymatique de BoNTA ou BoNTB ont été identifiés [312,313]. Cependant aucun de ces différents inhibiteurs n'a encore été testé sur des cellules en culture ou sur des souris.
- le développement d'une stratégie de leurres (decoy) avec des récepteurs solubles. Cependant cette stratégie nécessite de connaître les récepteurs neuronaux des toxines botuliques. Or seuls les récepteurs des toxines B et G ont été identifiés : pour ces deux sérotypes des stratégies utilisant des récepteurs solubles ont été testées comme antitoxines sur des cultures de cellules *in vitro* [306,307] ou sur des souris [307].

Notre projet s'inscrit dans le cadre de la production d'anticorps neutralisants pour chaque sérotype.

3.2 Procédés d'obtentions d'antisérums anti-BoNT

Pour obtenir des antisérums anti-toxine botulique il faut immuniser des animaux avec un fragment immunogène. Il existe différentes techniques d'immunisation (tableau 3.1). Nous ne détaillerons que très brièvement quelques techniques possibles pour insister sur celle que nous avons utilisée : l'immunisation génétique.

Fragment immunogène	Avantages	Inconvénients
Virus ou bactérie vivant(e)s et atténué(e)s	Réponse cellulaire et humorale	Risque de réversion de la souche virulente, composition mal définie
Virus ou bactérie tué(e)s et inactivé(e)s	Pas de risque d'infection	Moins efficace, composition mal définie
Composants purifiés de pathogènes	Composition bien définie	Nécessité de culture à grande échelle de pathogène, peu immunogène, nécessité d'adjuvants
Peptides synthétiques	Composition bien définie, préparation simple, pas de risque de pathogénicité	Demie-vie courte, nécessité d'adjuvants
Protéines recombinantes	Composition bien définie, pas de risque de pathogénicité, production et purification à coût raisonnable	Réponse humorale principalement, nécessité d'adjuvants
ADN	Réponse cellulaire et humorale, production à moindre coût, sécurité, stabilité	Efficacité de transfection, risque potentiel d'intégration dans le génome ?
ARN	Pas de risque d'intégration dans le génome, pas besoin d'atteindre le noyau, sécurité	Instable, coût de production élevé

TAB. 3.1 – Types d'immunisation possibles et leurs caractéristiques.

La méthode classique consiste à réaliser des cultures en fermenteurs de *Clostridium Botulinum* [314]. La toxine botulique est séparée du surnageant de culture par précipitation à froid, puis

séparée du surnageant par filtration et centrifugation. La toxine précipitée doit être ensuite lavée, extraite et filtrée pour retirer toute trace de bactérie. La toxine est enfin détoxifiée en ajoutant de la formaline. Cette méthode nécessite une installation GMP (Good Manufacturing Product) dédiée et présente donc un coût très important pour des rendements faibles. Elle nécessite de plus de manipuler de grande quantité de toxine, ce qui pose des problèmes de sécurité.

La deuxième méthode consiste à produire le fragment immunogène recombinant chez *E.coli*. Cette technique ne nécessite plus d'installation GMP dédiée, permet de meilleurs rendements sans être toxique et le coût est beaucoup moins élevé. Cependant cette technique nécessite encore des étapes de purification de la protéine recombinante.

La troisième méthode consiste à injecter directement dans l'animal l'ADN codant le fragment immunogène : l'animal exprimera de façon endogène ce fragment immunogène de toxine, qui servira d'antigène et déclenchera une réponse immune. Cette stratégie présente de nombreux avantages en terme d'immunogénicité (peut induire une réponse à la fois cellulaire et humorale, en injectant de faibles quantités d'ADN), de sécurité (pas de risque de réversion, pas de traitement toxique), de fabrication (ADN plasmidique simple d'utilisation, facile à tester, production à large échelle facile et à moindre coût), de stabilité (longue durée de vie, stable en fonction de la température) et de transport (facilité de conservation et de transport, pas besoin de chaîne du froid) [315]. Nous souhaitons utiliser cette méthode combinée à la technique d'électrotransfert qui est simple et facile à mettre en oeuvre. Cet outil nous permettrait ainsi de nous affranchir de la purification de protéines recombinantes.

3.3 Fragment immunogène

Divers travaux ont d'ores et déjà été réalisés pour déterminer le fragment immunogène de ces neurotoxines.

Etudes sur la toxine tétanique

Il a d'abord été montré que le fragment C-terminal de la chaîne lourde (Hc) de la toxine **tétanique**, obtenu par protéolyse par la papaïne et purifié par chromatographie, est non toxique et protège les souris contre une dose de toxine [304]. Puis, ce fragment a été produit en tant que protéine recombinante chez *Escherichia coli* et s'est également révélé un excellent immunogène [316].

Etudes sur les neurotoxines botuliques

Parmi tous les fragments recombinants de neurotoxine botulique A testés, le seul qui induise une protection complète des souris est le domaine C-terminal de la chaîne lourde, qui correspond au domaine Hc de la neurotoxine tétanique [317–320].

Les anticorps monoclonaux neutralisants obtenus avec la neurotoxine botulique A entière détoxifiée comme immunogène étaient tous dirigés contre le fragment C-terminal de la chaîne lourde. L'analyse des anticorps générés par vaccination avec la neurotoxine botulique entière formolée chez l'homme a montré que la plupart étaient dirigés contre la chaîne légère et peu contre le fragment Hc. Cette étude a conclu qu'un vaccin basé sur le fragment Hc est plus protecteur qu'un vaccin préparé avec la toxine entière [321]. De ce fait, la deuxième génération de vaccin antitobotulique développée par l'USAMRIID consiste en des fragments Hc recombinants et purifiés des sept toxinotypes de neurotoxines botuliques.

La protection à l'aide d'anticorps neutralisants de neurotoxine consiste essentiellement en le blocage de la reconnaissance du récepteur cellulaire par le fragment Hc [321].

De nombreux travaux ont été réalisés pour obtenir des anticorps monoclonaux neutralisants contre les neurotoxines botuliques. Les essais réalisés avec la neurotoxine botulique A entière se sont fréquemment révélés infructueux alors que ceux produits en immunisant des souris avec la protéine recombinante Hc ont permis d'obtenir un nombre significatif d'anticorps monoclonaux neutralisants [322–324].

Ainsi, le fragment Hc se révèle être un meilleur immunogène que la neurotoxine entière et détoxifiée pour induire des anticorps neutralisants.

3.4 Mécanisme de l'immunisation par ADN

La possibilité d'obtenir une immunisation par injection d'un ADN a été démontrée pour la première fois il y a une dizaine d'années [173, 174]. Elle consiste à injecter directement dans le muscle squelettique ou la peau les gènes codant des protéines antigéniques. L'organisme lui-même produit les antigènes qui vont induire une réaction immunitaire à la fois cellulaire et humorale (voir Introduction).

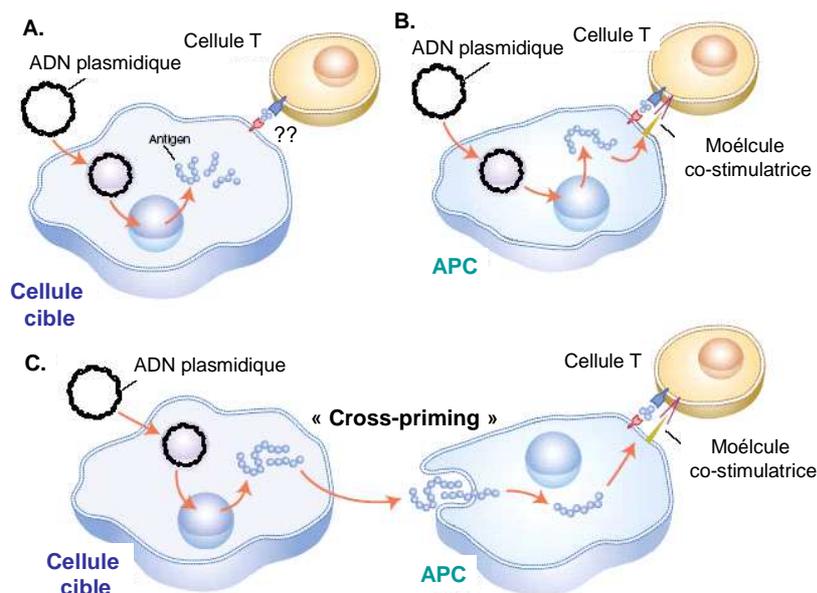


FIG. 3.5 – Mécanismes possibles de l'immunisation génétique. Adapté d'après [325]

Le mécanisme exact de cette réponse immune après transfert d'ADN dans le tissu cible n'est pas totalement élucidé.

Lorsqu'un ADN plasmidique (ou un ADN véhiculé par un virus) codant un antigène est transfecté dans un tissu cible, les cellules musculaires ou les cellules de la peau transfectées peuvent présenter par des molécules de classe I du CMH l'antigène à leur surface mais elles n'expriment pas de molécule de classe II du CMH [326] (figure 3.5 A.). Elles ne peuvent pas recruter directement des cellules T cytotoxiques induisant une réponse cellulaire cytotoxique mais elles peuvent être reconnues par des cellules T CD8+ cytotoxiques activées par la voie des APC. Il faut donc que des cellules dendritiques ou des macrophages aient été initialement activées et initient la réponse immune en présentant l'antigène sur des molécules du CMH de classe I et II,

par un mécanisme de «cross-présentation». Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer la présentation des antigènes par les APC. Il semblerait que lors de la transfection, certaines cellules présentatrices d'antigènes soient directement transfectées (macrophages et/ou cellules dendritiques) (figure 3.5 B.), elles pourraient alors présenter sur des molécules du CMH de classe I et II les antigènes et ainsi induire une réponse à la fois cellulaire cytotoxique et humorale.

Weeratna et al. par exemple, ont comparé l'injection en intramusculaire d'un plasmide codant un antigène de surface de l'hépatite B sous contrôle d'un promoteur muscle spécifique (promoteur de la créatine kinase), ou sous contrôle d'un promoteur CMV ubiquitaire. Ils ont observé une réponse immune uniquement avec le promoteur CMV [327], suggérant fortement que si les APC ne sont pas transfectées (ce qui est le cas avec un promoteur muscle spécifique), la réponse immune ne peut être initiée. Une même étude comparant des promoteurs a été réalisée par De Geest et al. suggérant là encore une réponse immune strictement dépendante de l'expression de l'antigène par des APC [328]. Torres et al. ont également montré qu'une réponse immune pouvait être maintenue même si le site d'injection était prélevé 5 minutes après l'injection, suggérant que des cellules distantes du site d'injection devaient avoir été transfectées (probablement des APC) [329]. De la même façon, Casares et al. ont montré que des APC prélevées et isolées au niveau du site d'injection après immunisation génétique étaient ensuite capable de présenter des antigènes à leur surface *in vitro*, indiquant que ces antigènes étaient soit directement exprimés soit acquis par ces cellules [330]. Enfin, plusieurs études ont observé la présence, au niveau des ganglions lymphatiques et de la rate, de cellules dendritiques et de macrophages contenant l'ADN plasmidique et son produit protéique, suite à une immunisation génétique dans la peau [331,332], ou en intramusculaire [333].

La transfection directe des cellules présentatrices d'antigène n'est pas le seul mécanisme permettant une réponse immune. De nombreuses études montrent que les cellules non présentatrices d'antigène, telles que les myocytes ou des kératinocytes, sont directement impliquées dans l'induction d'une réponse immune [193]. Il semblerait que les cellules non-APC soient capables de libérer l'antigène qu'elles expriment ou des fragments peptidiques qui seraient ensuite «engloutis» par des APC permettant leur présentation : c'est le procédé de «cross-priming» (figure 3.5 C.).

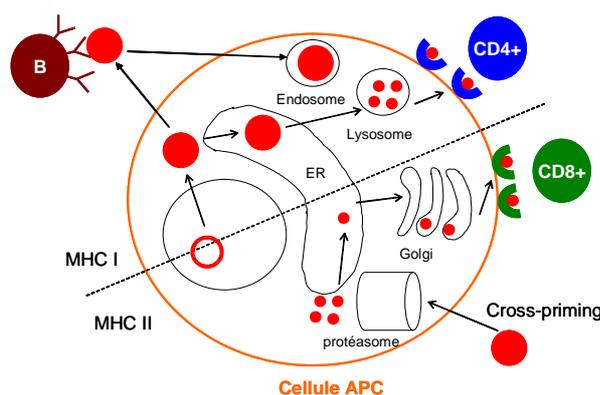


FIG. 3.6 – Les voies de présentation d'antigènes par les APC.

On peut supposer que les signaux de «danger», causés par l'injection elle-même ou l'électrotransfert ou toute autre technique physique, puissent conduire à l'apoptose de certaines cellules transfectées qui génère des débris cellulaires et conduit à la libération de l'antigène (ou d'un fragment cellulaire présentant l'antigène) dans des zones accessibles aux APC et cet antigène

serait alors endocyté ou phagocyté par des cellules présentatrices d'antigène (procédé de «cross-priming», figure 3.6) qui vont ensuite être capables de le présenter à leur tour sur des molécules de classe I et II du CMH [315, 326]. Si l'antigène possède un signal de sécrétion, les APC pourraient endocyté directement l'antigène et le présenter sur des molécules de classe II du CMH induisant une réponse humorale. Là encore un «cross-priming» pourrait avoir lieu conduisant à une présentation par des molécules de classe I du CMH. Il faut noter que l'électrotransfert permet de favoriser cette réponse immune en induisant d'une part un taux d'expression d'antigène élevé mais également une réponse inflammatoire et une infiltration cellulaire [334].

Le mécanisme par lequel les APC acquièrent l'antigène n'est pas totalement élucidé mais le rôle crucial de cette étape a été clairement établi.

Nous avons résumé de façon schématique et très simplifiée les mécanismes proposés pour une telle réponse immune après transfert d'ADN dans le tissu cible (figure 3.7), d'après [315, 326, 327, 335]).

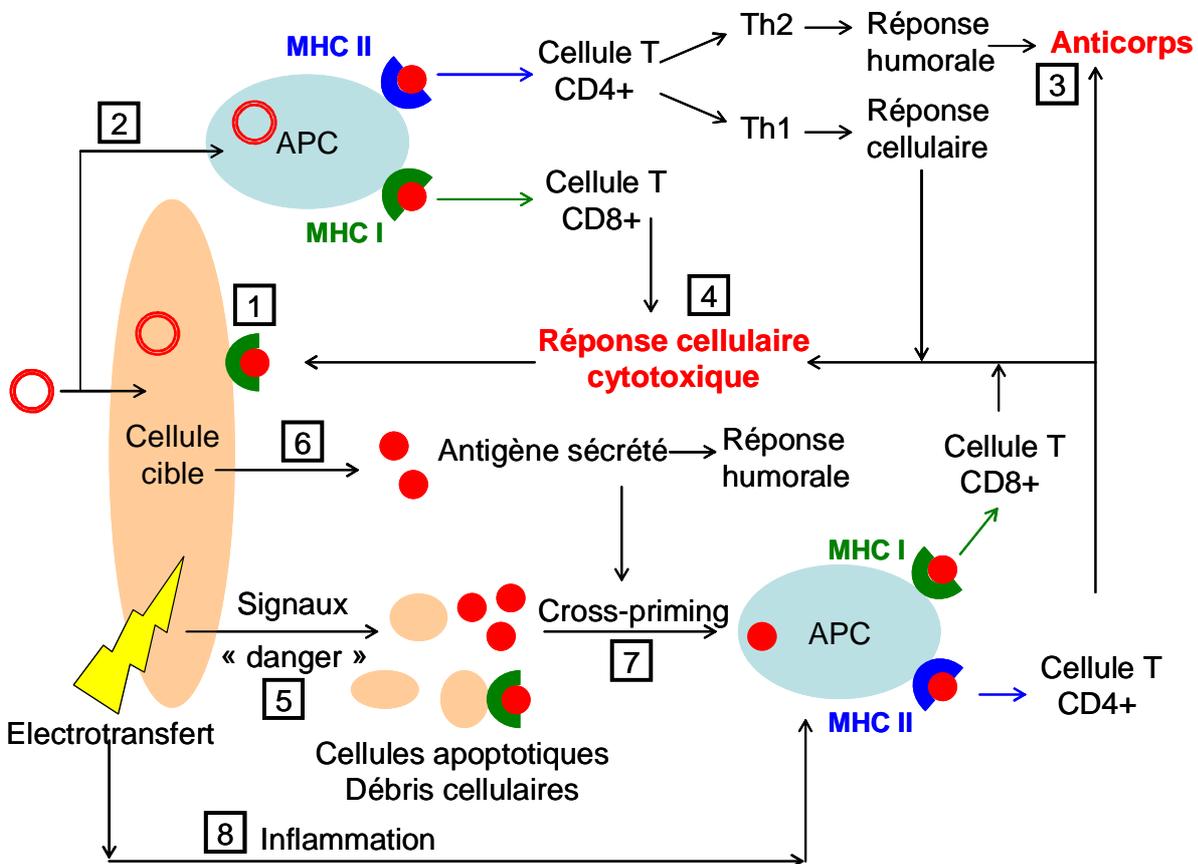


FIG. 3.7 – Mécanismes possibles de présentation de l'antigène après immunisation génétique. (1) présentation de l'antigène sur des molécules du CMH I par les cellules cibles non APC, (2) transfection directe d'APC, induisant une réponse humorale (3) ou cellulaire cytotoxique (4), des signaux de danger (5) induisant la libération extracellulaire d'antigène, ou sa sécrétion directe (6) peuvent conduire au mécanisme de «cross-priming» (7) permettant la présentation sur des molécules du CMH de classe I ou II. L'inflammation causée par l'électrotransfert (8) peut favoriser cette réponse immune. Schéma réalisé d'après [315, 326, 327, 335]

Dans le cadre de la vaccination par ADN, plusieurs études ont montré que l'injection seule d'un plasmide codant le fragment C-terminal de la toxine botulique A ou F permettait d'immu-

niser les souris injectées contre ces toxines.

Clayton et al. ont étudié la possibilité d'utiliser la vaccination par ADN pour protéger des souris contre la toxine botulique A [336]. Après 4 injections de $50\mu\text{g}$ d'un plasmide codant le fragment C-terminal de la toxine botulique A optimisé pour une expression maximale chez *E.coli* ils ont observé une certaine protection des souris contre la toxine, mais bien inférieure à celle observée avec la protéine recombinante. Dans une étude similaire, Shyu et al. ont utilisé en injection seule le fragment C-terminal de la toxine A précédé d'un signal de sécrétion. Après 10 injections de $100\mu\text{g}$ de plasmide, ils observent une protection des souris [337]. Enfin, Bennett et al. ont montré une protection des souris après cinq injections de $100\mu\text{g}$ de plasmide codant le fragment C-terminal de la toxine botulique F précédé d'un signal de sécrétion ($\text{Ig}\kappa$) [338].

3.5 Description du projet

L'objectif du projet est d'examiner le potentiel de l'électrotransfert d'ADN plasmidique pour l'obtention d'anticorps neutralisants à haut titre, à usage thérapeutique, contre les toxines botuliques A à G. Le but est d'utiliser la technique d'électrotransfert pour immuniser des animaux avec des plasmides codant des fragments non toxiques des toxines botuliques. Les animaux ainsi traités exprimeront de façon endogène ces fragments de toxines, qui serviront d'antigènes et déclencheront une réponse immune, selon le principe de la vaccination par ADN (figure 3.8). **Le but est d'obtenir des sérums ayant un titre élevé en anticorps neutralisants.**

Diverses stratégies sont envisagées pour augmenter la réponse humorale et obtenir des titres élevés d'anticorps neutralisants dans les sérums des souris immunisées : le choix de l'antigène, la dose, le protocole optimal en terme de techniques et de déroulement de l'expérience et l'utilisation éventuelle d'adjuvants.

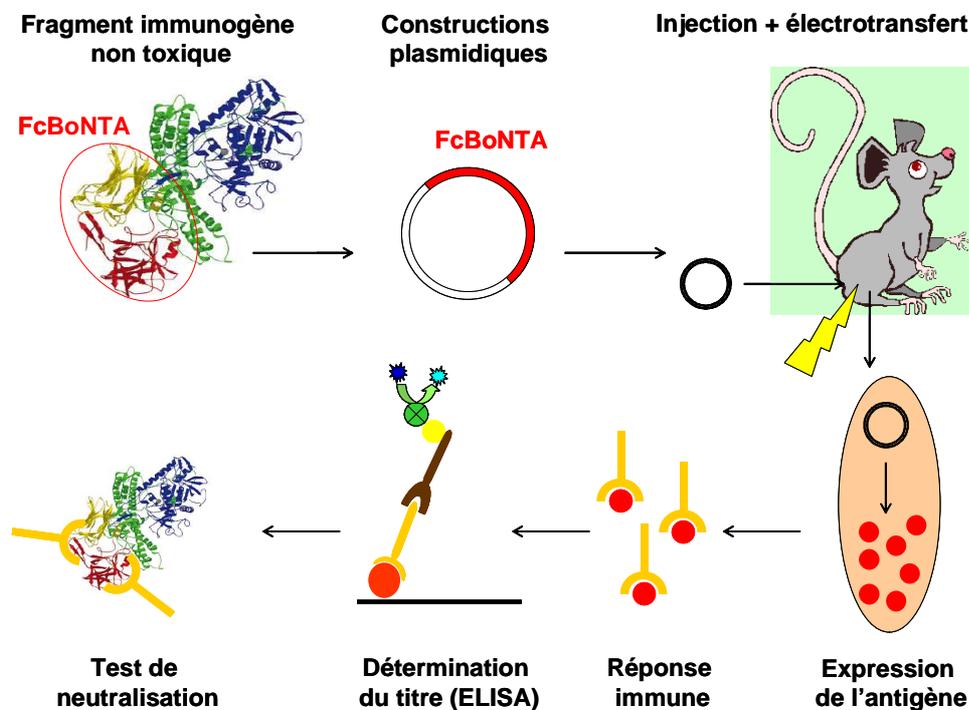


FIG. 3.8 – *Projet.*

3.6 Première évaluation : antisérums anti-BoNTA

3.6.1 Construction et validation du matériel génétique de départ

Le matériel génétique de départ nécessaire à la construction des plasmides d'expression eucaryote nous est fourni par le laboratoire du Dr. Michel Popoff (Unité Bactéries Anaérobies et Toxines de l'Institut Pasteur). Nous avons choisi de travailler avec le fragment C-terminal de la toxine botulique A (que nous noterons FcBoNTA), qui est la mieux connue et touche l'homme.

Le fragment FcBoNTA, extrait du plasmide pCR2.1-FcToxA, est inséré dans le vecteur d'expression eucaryote pVax2 sous contrôle d'un promoteur CMV. De nombreuses études ont en effet montré que le promoteur CMV était le plus efficace pour une expression maximale dans le muscle [194, 339, 340]. Le plasmide obtenu est noté pVaxFcBoNTA.

La fonctionnalité du plasmide est vérifiée par transfection transitoire sur des cellules de mélanome de souris B16. Une RT-PCR spécifique à partir de l'ARN extrait du lysat cellulaire nous permet de détecter le transcrite du fragment FcBoNTA (figure 3.9).

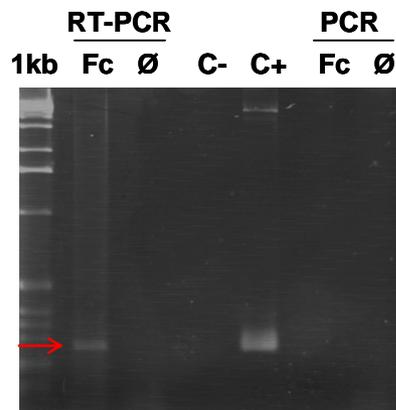


FIG. 3.9 – *Analyse par RT-PCR de la présence du transcrite correspondant au fragment FcBoNTA dans le lysat cellulaire après transfection.* L'ARN total des cellules transfectées est extrait par la méthode du TRizol. Une RT spécifique est effectuée avec les amorces appropriées avant amplification par PCR d'un fragment de 259pb de l'ADNc du fragment FcBoNTA (amorce sens : 5'tgcatcacaggcagcgctag3', amorce antisens : 5'cccatgagcaacccaaagtcc3'). Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Notations : 1kb : marqueur de taille; Fc : transfection avec le plasmide pVaxFcBoNTA; Ø : contrôle cellules non transfectées; C- : PCR sans ADN; C+ : PCR sur le plasmide pVaxFcBoNTA. En contrôle, une PCR est effectuée directement sur les ARN extraits avant RT des deux conditions.

Par contre un marquage immunofluorescent sur des cellules fixées d'une transfection équivalente avec un anticorps monoclonal anti-FcBoNTA ne nous permet pas de détecter la présence de la protéine. La sensibilité de la détection est peut-être trop faible, ou la protéine n'est pas suffisamment exprimée.

Nous décidons tout de même de tester ce plasmide pVaxFcBoNTA *in vivo*.

3.6.2 Première évaluation *in vivo* : preuve du concept

Une première étude est réalisée pour vérifier que l'injection et électrotransfert d'un plasmide codant le fragment C-terminal de la toxine botulique A peut conduire à la production d'anticorps anti-FcBoNTA, et que ces anticorps sont neutralisants vis-à-vis de la neurotoxine botulique A

entière.

Un groupe de souris est injecté et électrotransféré dans le muscle tibial cranial avec $40\mu\text{g}$ de plasmide pVaxFcBoNTA. Deux autres groupes de souris sont injectés et électrotransférés avec $20\mu\text{g}$ ou $40\mu\text{g}$ de plasmide pVaxFcBoNTA à J0 et traités à nouveau à J21 avec les mêmes doses de plasmide. Un groupe de souris contrôle ne reçoit aucun traitement. Des prélèvements de sang sont effectués régulièrement à 15, 21, 35, 49 et 154 jours après le début de l'expérience. La détection des anticorps anti-FcBoNTA dans le sérum est effectuée par un test ELISA.

Nous avons tout d'abord analysé les résultats obtenus avec les deux groupes de souris réinjectées à J21 (figure 3.10).

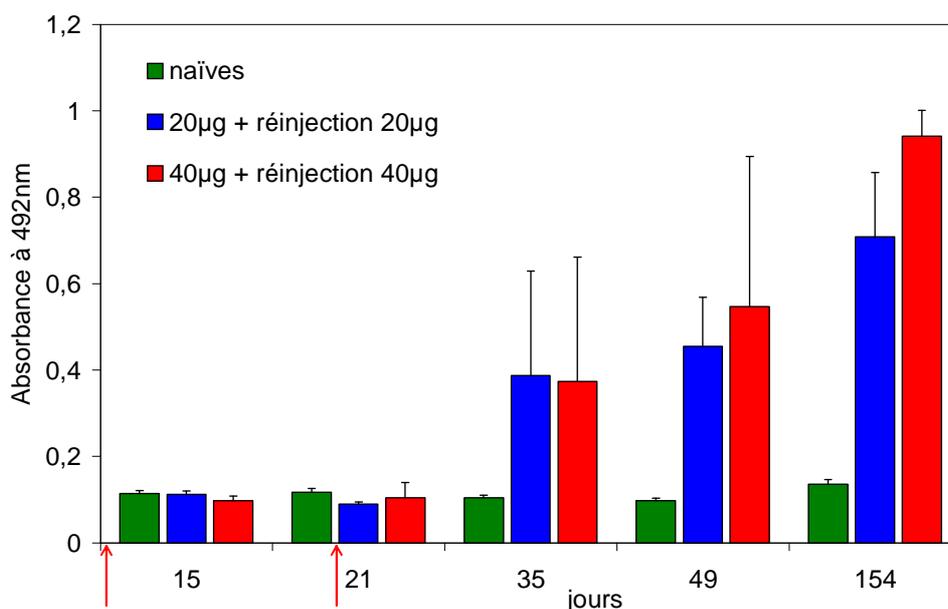


FIG. 3.10 – *Première évaluation : comparaison de deux doses de plasmide injectées.* Les souris (SWISS, 3 animaux par groupe) sont injectées et électrotransférées dans le muscle tibial cranial avec le plasmide pVaxFcBoNTA (20 ou $40\mu\text{g}$). Les flèches rouges indiquent les deux électrotransferts (J0 et J21). Des échantillons de sang sont prélevés régulièrement aux temps indiqués et un ELISA est effectué sur des dilutions de sérums au $1/100^e$ dans une solution PBS-Tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%) pour détecter la présence d'anticorps anti-FcBoNTA dans le sérum. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD des absorbances à 492nm obtenues.

Cette première évaluation nous permet de conclure qu'il est possible d'obtenir des anticorps anti-FcBoNTA par injection et électrotransfert de plasmide codant le fragment C-terminal Fc-BoNTA de la toxine botulique A : en effet on observe une différence significative entre les lots traités et le lot contrôle. Cependant il ne semble pas, du moins dans cette première étude, y avoir de différence significative entre les deux groupes de souris traitées avec 20 ou $40\mu\text{g}$ d'ADN, sauf à long terme.

Comparons maintenant les deux groupes traités avec $40\mu\text{g}$ de plasmide, mais l'un ayant eu une deuxième injection à J21, l'autre non (figure 3.11).

On n'observe pas de différence significative entre les deux groupes réinjectés ou pas.

Il faut cependant noter que pour ces deux premiers graphes, les groupes n'étaient constitués que de trois souris au départ. Ce nombre de souris est trop faible pour avoir des résultats statistiques très robustes, mais nous donne des informations à titre indicatif.

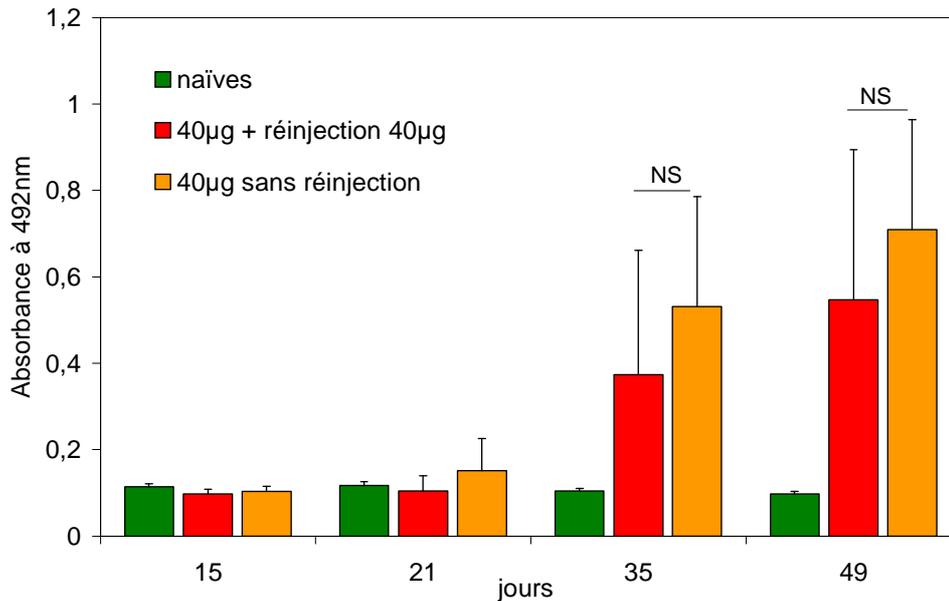


FIG. 3.11 – *Première évaluation : comparaison de deux lots avec ou sans réinjection.*

Les souris SWISS ($n=3$) sont injectées et électrotransférées dans le muscle tibial cranial avec $40\mu\text{g}$ de plasmide *pVaxFcBoNTA*. Des échantillons de sang sont prélevés régulièrement aux temps indiqués et un ELISA global est effectué sur des dilutions de sérums au $1/100^e$ pour détecter la présence d'anticorps anti-FcBoNTA. Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD des absorbances à 492nm).

Cette première évaluation nous permet uniquement de conclure qu'il est possible d'obtenir des anticorps dirigés contre le fragment C-terminal de la toxine botulique A par électrotransfert de plasmide. Nous confirmons aussi qu'il est possible d'obtenir des anticorps contre le fragment C terminal de la toxine botulinique A, qui est produite ici de manière intracellulaire (car il n'y a pas de signal de sécrétion) par le myotube transfecté. Il a déjà été montré que des anticorps peuvent être produits dans le cas de protéines intracellulaires, notamment contre la beta-galactosidase [341]. Des anticorps neutralisants ont également été obtenus contre la protéine intracellulaire L1 du papillomavirus [342]. Par contre dans notre cas, le protocole optimal d'obtention d'antisérums anti-toxines reste à définir.

3.6.3 Test de neutralisation

Avant d'aller plus loin dans le projet nous avons analysé certains de ces sérums par un test de neutralisation pour savoir si ces anticorps obtenus contre le fragment C-terminal de la toxine botulique A étaient neutralisants.

Ce test de neutralisation (ou test de létalité) est effectué dans le laboratoire du Dr. M. Popoff à l'Institut Pasteur : pratiquement, la toxine botulique de type A est produite et calibrée à 10 Doses Létales Souris par ml. Des dilutions de sérum sont ensuite mises en incubation avec 1 ml de préparation de toxine 30 minutes à 37°C , et injectées à des souris par voie intrapéritonéale à raison de 1 ml par souris et par dilution. Les souris sont ensuite observées pendant quatre jours. Les résultats sont exprimés en unités neutralisantes par ml, une unité neutralisante correspondant au volume de sérum neutralisant 10 Doses Létales Souris (10MLD).

Nous avons tout d'abord réalisé un ELISA avec les sérums des derniers points de la cinétique

(figure 3.12) pour déterminer les sérums ayant le plus haut titre en anticorps. En contrôle, le laboratoire du Dr. M. Popoff nous a fourni un sérum de souris immunisées par des injections de protéine recombinante.

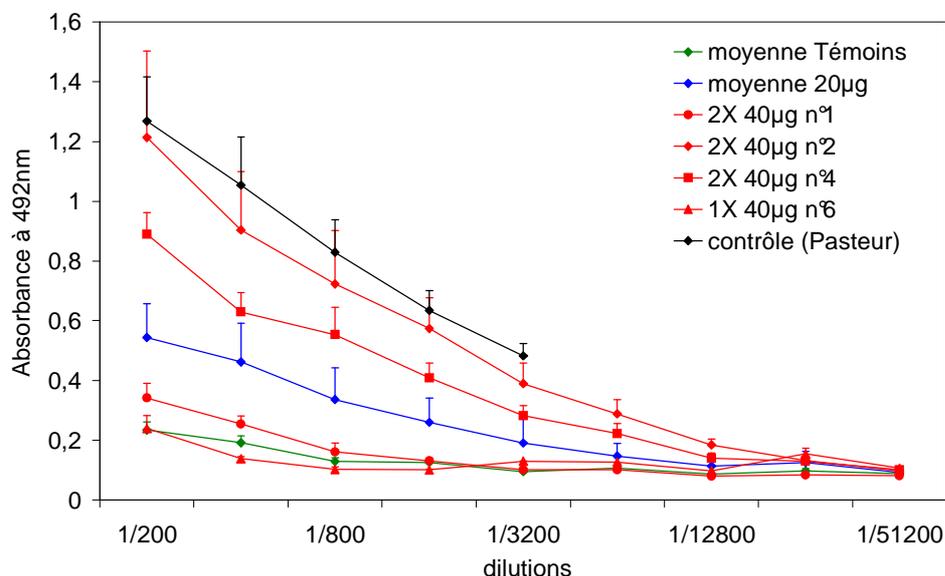


FIG. 3.12 – **ELISA global 172 jours après le début de l'expérience.** Pour les souris naïves et traitées avec 20 µg, seule la moyenne est représentée. Pour les souris traitées avec 40µg, le résultat pour chaque souris (n°1, 2, 4 et 6) est représentée. En contrôle nous avons dosé un sérum de souris fourni par le Dr. Michel Popoff (correspondant à une injection de protéine recombinante). L'ELISA est réalisé sur des dilutions croissantes de sérum dans du PBS-Tween20 (0,1%)-gélatine (0,2%).

NB : Nous avons utilisé pour toute notre étude la définition suivante pour le titre en anticorps : c'est l'inverse de la dilution pour laquelle la différence de DO entre un sérum traité et un sérum non traité est de 0,3 (voir Matériel et Méthodes).

Nous avons testé le pouvoir neutralisant des sérums des deux souris ayant le titre en anticorps le plus élevé au dernier jour de la cinétique (figure 3.12). Ces deux souris (n°2 et 4) ont été injectées et électrotransférées deux fois avec 40µg de plasmide pVaxFcBoNTA, l'une 21 jours après (souris 4), l'autre 110 jours après le premier traitement (souris 2).

Ces sérums sont testés aux dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} contre 10 doses létales de toxine botulique A, avec 1 souris par dilution. Le tableau 3.2 présente les souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés.

Sérum	Dilutions				Titre neutral. pour 10MLD
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
souris n°2	1/1	0/1	0/1	0/1	100
souris n°4	1/1	1/1	0/1	0/1	1000

TAB. 3.2 – **Test de neutralisation contre la toxine botulique A.** Les résultats correspondent au nombre de souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés. Les titres neutralisants sont exprimés en unités neutralisantes par ml (une unité neutralisante correspondant au volume de sérum neutralisant 10 Doses Létales Souris)

Les titres obtenus pour les deux sérums sont entre 100 et 1000, ce qui n'est pas très élevé mais démontre cependant que les anticorps obtenus par électrotransfert ont un pouvoir neutralisant sur la toxine botulique A.

3.7 Optimisation du fragment immunogène

Nous avons montré qu'il était possible d'obtenir des anticorps neutralisants dirigés contre la toxine botulique A par injection et électrotransfert, dans le muscle tibial cranial d'une souris, d'un plasmide codant le fragment C-terminal FcBoNTA de cette toxine. Cependant il est nécessaire d'améliorer la séquence du fragment immunogène pour une production optimale d'anticorps neutralisants [93]. Cette amélioration peut être obtenue en optimisant la séquence de l'antigène au niveau de l'usage des codons pour une expression maximale ou encore en modifiant la localisation cellulaire de l'antigène [343].

3.7.1 Optimisation des codons

Partant de la constatation que nous n'avons pas pu détecter le fragment FcBoNTA par immunofluorescence sur des cellules transfectées, bien que l'ARN transcrit soit présent, on peut supposer que l'expression du fragment FcBoNTA dans des cellules eucaryotes n'est pas optimale. Le problème vient vraisemblablement de la traduction. En effet, si l'on compare la fréquence de l'usage des codons chez *Clostridium botulinum* et chez *Mus musculus*, on s'aperçoit que les différences sont très importantes (figure 3.13).

UUU	15,5	45,4	UCU	10,7	23,6	UAU	12,6	54,5	UGU	10,0	6,8
UUC	23,8	6,1	UCC	14,2	3,1	UAC	17,8	5,9	UGC	12,0	1,7
UUA	6,5	55,5	UCA	15,1	22,0	UAA	0,7	1,1	UGA	1,1	0,0
UUG	9,0	8,4	ACG	4,2	1,4	UAG	1,1	0,3	UGG	15,8	11,5
CUU	11,8	11,4	CCU	14,3	13,7	CAU	11,4	5,7	CGU	3,3	2,6
CUC	18,4	0,9	CCC	16,5	2,0	CAC	22,2	0,8	CGC	7,0	0,3
CUA	13,0	8,7	CCA	18,8	13,2	CAA	16,5	26,9	CGA	5,3	1,1
CUG	30,3	0,7	CCG	5,8	1,0	CAG	49,8	4,2	CGG	6,9	0,2
AUU	15,9	44,4	ACU	13,0	23,8	AAU	18,7	103,7	AGU	8,9	24,2
AUC	25,4	5,3	ACC	15,2	2,9	AAC	26,4	12,0	AGC	15,9	5,1
AUA	18,1	54,7	ACA	23,3	22,8	AAA	46,8	62,6	AGA	20,1	20,3
AUG	22,7	16,2	ACG	4,4	2,1	AAG	30,1	14,7	AGG	14,0	3,3
GUU	5,8	21,0	GCU	12,4	15,0	GAU	18,2	53,7	GGU	9,1	13,7
GUC	10,0	1,1	GCC	19,4	1,9	GAC	28,9	6,0	GGC	17,5	2,7
GUA	8,3	21,9	GCA	17,8	15,2	GAA	31,7	49,3	GGA	15,7	21,0
GUG	17,6	3,1	GCG	6,2	1,2	GAG	30,4	10,0	GGG	10,8	4,2

Mus musculus // *Clostridium botulinum*

FIG. 3.13 – Comparaison de la fréquence des codons chez *Mus Musculus* et *Clostridium Botulinum*. Tableau réalisé d'après les données obtenues sur le site <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Deux illustrations de fréquences très différentes sont soulignées en rouge et bleu.

En utilisant le logiciel en ligne Graphical Codon Usage Analyser (<http://gcu.schoedl.de>, Geneart), la comparaison des tables d'usage des codons révèle une différence moyenne de 28,8% avec des différences significatives pour certains codons (à titre de comparaison, le même logiciel nous donne une différence moyenne de 12,5% entre la souris et *E.coli* et 1,3% entre l'homme et la souris) : cela signifie que la souris et *Clostridium botulinum* n'utilisent pas majoritairement les mêmes codons pour coder un acide aminé donné. Il en résulte que la quantité d'ARN de transfert disponible chez ces deux espèces est très différente, et la présence de codons rares au sein d'un gène entraîne donc une baisse du niveau de traduction de ce dernier.

Un des moyens d'optimiser l'expression d'une protéine chez une espèce donnée consiste donc à optimiser la séquence du gène codant cette protéine en remplaçant les codons rares par des codons plus usités chez cette espèce sans modifier la séquence protéique. Dans notre cas, cela revient donc à synthétiser une nouvelle séquence de FcBoNTA, en remplaçant les codons utilisés majoritairement chez *Clostridium botulinum* par ceux utilisés majoritairement chez la souris.

Nous avons fait appel à la société Geneart pour synthétiser la séquence du fragment FcBoNTA en optimisant les codons pour une expression optimale chez la souris. Le fragment ainsi optimisé est noté Fc*BoNTA. Cette société utilise le logiciel GeneOptimizerTM, qui étudie plusieurs paramètres sur la séquence d'intérêt : la fréquence de chaque codon pour chacun des organismes, l'optimisation des codons pour une expression maximale, les éventuels sites de restrictions créés et le pourcentage de CpG. À partir de tous ces paramètres, une séquence optimale est déterminée. En alignant cette nouvelle séquence optimisée Fc*BoNTA avec la séquence native FcBoNTA, on constate effectivement que tous les codons ont été optimisés pour une expression maximale chez la souris (voir à titre d'exemple une portion de l'alignement, figure 3.14).

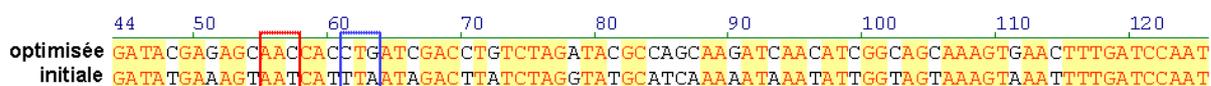


FIG. 3.14 – *Alignement des séquences avant et après optimisation.* Avec le logiciel AlignX de VectorNTI. Les séquences encadrées correspondent aux codons soulignés sur la figure 3.13.

Cette stratégie d'optimisation de codons a déjà été utilisée dans des stratégies de vaccination [343, 344]. Il peut s'agir d'optimiser la séquence pour une meilleure production de protéines recombinantes chez *E. coli*, Clayton et al. ont par exemple utilisé un gène optimisé de FcBoNTA pour une expression maximale de ce fragment recombinant chez *E. coli* [317]. Il peut s'agir également d'améliorer l'expression d'un antigène pour une expression maximale directement au sein des cellules cibles lors d'une immunisation génétique. Stratford et al. ont montré par exemple un apport de l'optimisation de codons sur le fragment C-terminal de la toxine tétanique lors d'une immunisation par injection intramusculaire de 200µg de plasmide : la séquence optimisée permet d'augmenter la production d'anticorps d'un facteur 10 par rapport à la séquence native [345].

3.7.2 Ajout d'un signal de sécrétion

Nous avons également voulu étudier l'apport d'un signal de sécrétion. En effet, le fragment FcBoNTA initial ne possède pas de signal de sécrétion et reste donc localisé à l'intérieur de la cellule. L'ajout d'un signal de sécrétion peut éventuellement améliorer la réponse immune et la production d'anticorps par une meilleure présentation de l'antigène. Plusieurs études semblent confirmer ce point : on peut citer par exemple une étude dans laquelle la séquence de la protéine E de l'enveloppe du virus de l'encéphalite japonaise a été modifiée pour être sécrétée en supprimant la partie transmembranaire de la protéine : le résultat de cette modification a été une bien

meilleure production d'anticorps et une meilleure protection [346]. De la même façon une étude portant sur différentes formes d'antigènes de surface du virus de l'hépatite B, a montré que toutes les formes conduisaient à une réponse cellulaire cytotoxique, mais la forme sécrétée donnait les titres en anticorps les plus élevés [347].

Doria et al. suggèrent également que l'on peut modifier le signal de sécrétion d'une protéine initialement sécrétée pour optimiser l'efficacité de sécrétion : on remplace le signal de sécrétion natif par celui d'une protéine connue pour être exprimée fortement [343].

Nous avons choisi les signaux de sécrétion de deux gènes couramment utilisés au laboratoire : l'érythropoïétine de souris (mEpo) et la phosphatase alcaline sécrétée humaine (hSeAP). Ces deux gènes ont été validés au laboratoire et nous savons que ces protéines sont correctement sécrétées.

3.7.3 Constructions des vecteurs optimisés

Le fragment Fc*BoNTA-Master, issu du plasmide 040288pPCR-Script (Geneart), est inséré dans le vecteur d'expression eucaryote pVax2 sous contrôle du promoteur CMV. Ce fragment contient le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique A, Fc*BoNTA, précédé du signal de sécrétion de l'érythropoïétine de souris et d'un signal Kozak gccacc. Le plasmide correspondant est noté pVaxFc*BoNTA-Master.

Le fragment Fc*BoNTA-Variant, issu du plasmide 040278pPCR-Script (Geneart), est inséré dans le vecteur d'expression eucaryote pVax2 sous contrôle du promoteur CMV. Ce fragment contient le fragment optimisé C-terminal de la toxine botulique A, Fc*BoNTA, précédé du signal de sécrétion de la phosphatase alcaline sécrétée humaine et d'un signal Kozak gccacc. Le plasmide correspondant est noté pVaxFc*BoNTA-Variant.

Enfin le plasmide pVaxFc*BoNTA est obtenu à partir du plasmide pVaxFc*BoNTA-Master en retirant le signal de sécrétion et la séquence Kozak.

Le schéma des différentes séquences codantes construites est présenté figure 3.15.

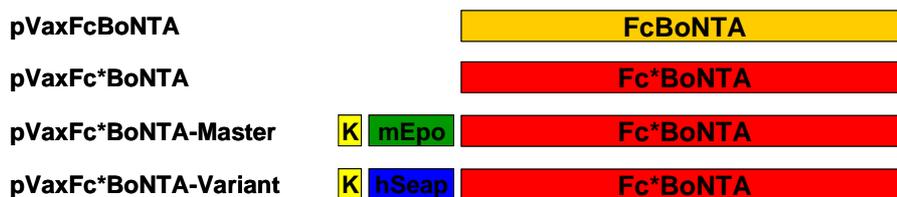


FIG. 3.15 – Schéma des séquences codantes avec la séquence optimisée (*Fc*BoNTA*) ou non (*FcBoNTA*).

3.7.4 Validation des vecteurs optimisés

Une fois construits, ces différents plasmides sont validés au niveau transcriptionnel (détection de l'ARN) et traductionnel (détection de la protéine).

Par RT-PCR

Pour vérifier la fonctionnalité des différents plasmides au niveau transcriptionnel, nous réalisons une transfection transitoire sur des cellules B16 (mélanome de souris). La transfection est réalisée en plaque 6 puits (100 000 cellules B16 par puits) avec 4nmoles de RPR209120/ μg

d'ADN, à raison de $1,5\mu\text{g}$ de plasmide par puits. Quarante-huit heures après transfection la présence des transcrits est montrée par RT-PCR à partir de l'ARN extrait du lysat cellulaire (figure 3.16) avec des amorces spécifiques de la séquence optimisée du fragment C-terminal de la toxine botulique A.

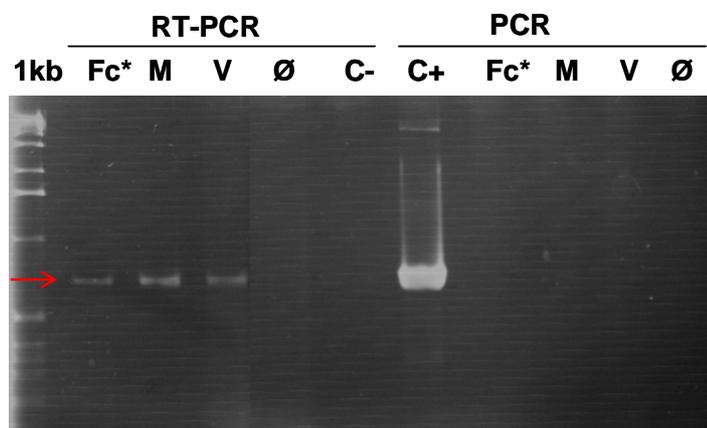


FIG. 3.16 – *Analyse par RT-PCR de la présence des transcrits dans le lysat cellulaire après transfection des différentes constructions contenant la séquence optimisée Fc*BoNTA.* Une RT spécifique est effectuée avec les amorces appropriées avant amplification par PCR d'un fragment de 703pb de l'ADNc du fragment Fc*BoNTA (amorce sens : 5'gctgaactacggcgagatcatctgg3', amorce antisens : 5'gatctccaggggcctcaggatctt3'). Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Notations : 1kb : marqueur de taille ; les cellules ont été transfectées avec différents plasmides notés : Fc* : pVaxFc*BoNTA ; M : pVaxFc*BoNTA-Master ; V : pVaxFc*BoNTA-Variant ; Ø : cellules non transfectées ; C- : PCR sans ADN ; C+ :PCR contrôle sur le plasmide pVaxFc*BoNTA. En contrôle, une PCR est effectuée directement sur les ARN extraits avant RT des différentes conditions.

Par marquage immunofluorescent

Une fois la RT-PCR réalisée, nous effectuons une immunofluorescence sur cellules fixées afin de détecter la protéine FcBoNTA. Pour cela une transfection sur des cellules B16 est réalisée en plaque 12 puits (80 000 cellules par puits) avec 4nmoles de RPR209120/ μg d'ADN, à raison de $0,5\mu\text{g}$ de plasmide par puits. Le marquage est réalisé 24 heures après transfection dans les différentes conditions testées : pVaxFcBoNTA, pVaxFc*BoNTA, pVaxFc*BoNTA-Master et pVaxFc*BoNTA-Variant. Un anticorps monoclonal fourni par le Dr. Hervé Volland (CEA) nous permet de détecter ce fragment C-terminal de la toxine botulique A. Les noyaux sont colorés au DAPI (figure 3.17).

Nous observons une localisation cytoplasmique de la protéine dans le cas de la transfection avec le plasmide pVaxFc*BoNTA. Là encore aucune expression n'est détectée dans le cas du fragment FcBoNTA non optimisé, la protéine doit être exprimée en trop faible quantité pour pouvoir la visualiser. Ceci nous confirme l'intérêt de cette optimisation des codons.

Dans le cas des plasmides pVaxFc*BoNTA-Master et Variant, la protéine semble être détectée dans des vésicules de sécrétion. Pour nous assurer de cette localisation nous avons effectué une double immunofluorescence avec d'une part un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine de l'appareil de Golgi, GM130, et d'autre part l'anticorps monoclonal anti-FcBoNTA. Les deux anticorps étant des anticorps de souris, nous avons au préalable biotinylé l'anticorps anti-

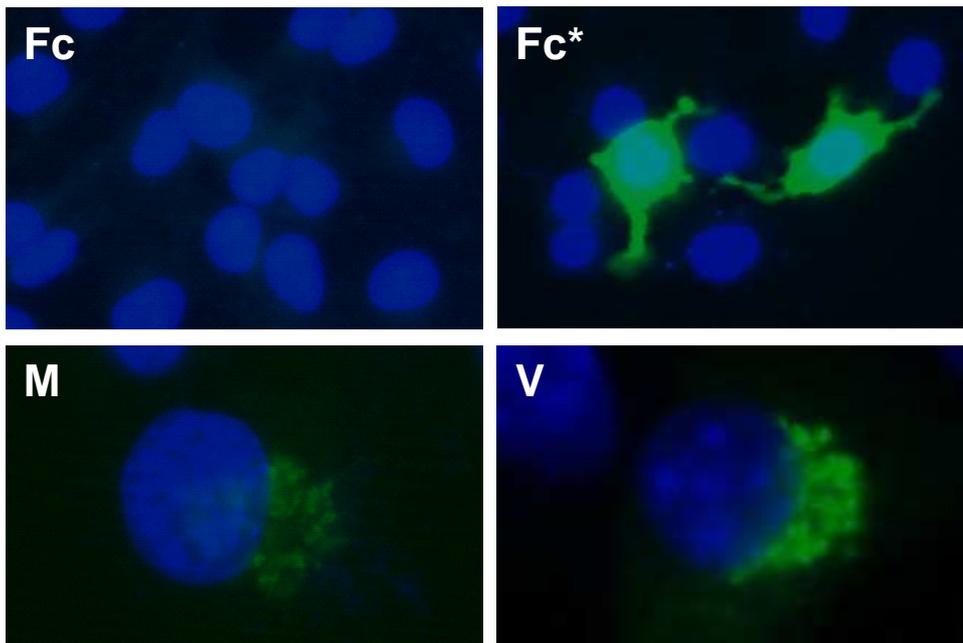


FIG. 3.17 – *Immunofluorescence pour la détection du fragment Fc de la toxine botulique A*. Immunofluorescence réalisée sur des cellules de souris B16 24h après transfection. AcI : anti-FcBoNTA dilué au 1/200^e. AcII : anti-souris IgG-FITC dilué au 1/400^e. Les noyaux sont marqués au DAPI. Observation au microscope à fluorescence. Conditions : Fc : pVaxFcBoNTA ; Fc* : pVaxFc*BoNTA ; M : pVaxFc*BoNTA-Master ; V : pVaxFc*BoNTA-Variant. Grossissement X40 pour les photos Fc et Fc* ; grossissement X100 pour les photos M et V.

FcBoNTA (voir Matériel et Méthodes) pour permettre une double détection des deux anticorps de manière indépendante. Le résultat de ce double marquage est observé au microscope confocal pour s'assurer de la co-localisation des deux marquages (figure 3.18).

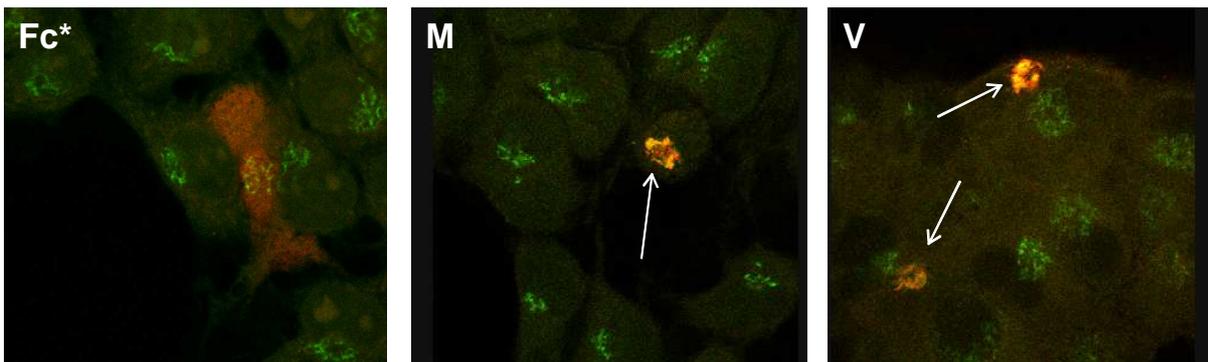


FIG. 3.18 – *Immunofluorescence pour la co-localisation du fragment Fc de la toxine botulique A et de l'appareil de Golgi*. Immunofluorescence réalisée sur des cellules de souris B16 24h après transfection. AcI : anti-FcBoNTA biotinylé dilué au 1/200 et anti-GM130 (Golgi) dilué au 1/250^e. AcII : streptavidine-rhodamine et anti-souris IgG-FITC dilués au 1/400^e. Observation au microscope confocal.

Le marquage du fragment FcBoNTA est observé en fluorescence rouge, celui de l'appareil de Golgi est observé en fluorescence verte : on observe effectivement une co-localisation des deux

marquages (détectable par une couleur jaune) pour les deux transfections avec les plasmides pVaxFc*BoNTA-Master et pVaxFc*BoNTA-Variant. Avec le plasmide pVaxFc*BoNTA, ne possédant pas de signal de sécrétion, on observe un marquage rouge cytoplasmique, et le marquage vert de l'appareil de Golgi distincts.

Par ELISA et Western-Blot

Pour déterminer la quantité de protéine sécrétée, dans le cas des deux plasmides pVaxFc*BoNTA-Master et Variant possédant un signal de sécrétion, nous réalisons une transfection sur cellules B16 en plaque 6 puits (100 000 cellules par puits) avec 4nmoles de RPR209120/ μg d'ADN, à raison de 1,5 μg de plasmide par puits. Six heures après transfection, le milieu de culture de la transfection est changé et remplacé par un milieu contenant 2% de sérum au lieu des 10% habituels. Le surnageant de culture est récupéré 48 heures après transfection. Le dosage par ELISA est encore en cours actuellement car nous avons eu des problèmes de mise au point.

En parallèle nous réalisons un Western-Blot à partir de ces surnageants de culture pour vérifier la nature de la protéine sécrétée. En contrôle la protéine recombinante est déposée (figure 3.19). On observe effectivement une bande spécifique du fragment FcBoNTA qui n'est pas présente dans la condition sans transfection.

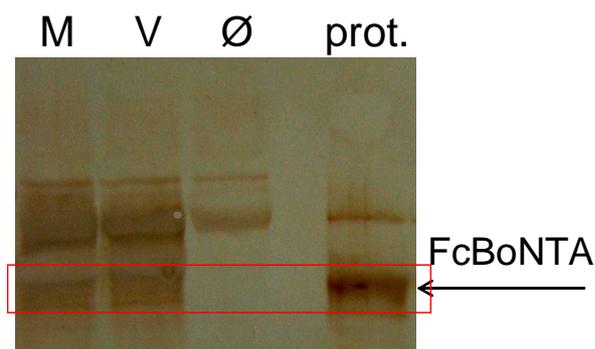


FIG. 3.19 – *Western-Blot pour la détection du fragment FcBoNTA sécrété dans le surnageant de culture in vitro.* M : pVaxFc*BoNTA-Master, V : pVaxFc*BoNTA-Variant, Ø : sans transfection, prot. : protéine recombinante.

L'ensemble des constructions plasmidiques étant donc validé *in vitro*, nous pouvons les tester *in vivo*.

3.7.5 Electrotransfert *in vivo* des différentes constructions

Les différentes constructions plasmidiques sont testées *in vivo* par injection et électrotransfert dans le muscle tibial cranial de souris SWISS (4 souris par condition). Nous avons testé l'ensemble des constructions présentées figure 3.15 en même temps mais les résultats sont présentés en dissociant l'apport de chaque paramètre pour une meilleure compréhension.

Toutes les expériences suivantes ont été réalisées selon le protocole suivant, sauf indication contraire :

- nous avons travaillé avec 4 souris SWISS par condition
- pour chaque expérience un lot de souris n'est pas traité (souris naïves) pour le calcul du titre en anticorps

- le plasmide d'intérêt est injecté à raison de $40\mu\text{g}$ dans $30\mu\text{l}$ de NaCl 0,9% dans le muscle tibial cranial de chaque souris
- les conditions d'électrotransfert sont de 8 impulsions de $200\text{V}/\text{cm}$, d'une durée de 20ms et d'une fréquence de 2Hz
- des prélèvements de sang sont effectués régulièrement (environ toutes les deux semaines) et le titre en anticorps pour chaque lot et à chaque temps est déterminé par dosage des anticorps dans le sérum grâce à un ELISA. Les résultats présentés correspondent à la moyenne $\pm\text{SD}$ des titres obtenus pour chaque souris ($n=4$).
- lorsque un test de neutralisation est nécessaire (test effectué à l'Institut Pasteur), les sérums des 4 souris de chaque lot à doser sont regroupés et testés aux dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} contre 10 doses létales de toxine botulique A (10MLD), à raison de 2 souris par dilution. Les résultats sont exprimés en nombre de souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés. Les titres neutralisants sont exprimés en unités neutralisantes par ml (une unité neutralisante correspondant au volume de sérum neutralisant 10 Doses Létales Souris).

Apport de la séquence optimisée

Avec le fragment natif FcBoNTA nous avons obtenu des titres en anticorps faibles, vraisemblablement dus à une mauvaise expression de la protéine dans les cellules musculaires. La première étude que nous effectuons est donc la comparaison des titres en anticorps obtenus avec la séquence native FcBoNTA et ceux obtenus avec la séquence optimisée pour l'usage des codons Fc*BoNTA. Nous avons d'ores et déjà montré *in vitro* une meilleure expression de la protéine (figure 3.17). Pour cela les plasmides pVaxFcBoNTA et pVaxFc*BoNTA sont injectés et électrotransférés et le titre en anticorps des différents lots est comparé (figure 3.20).

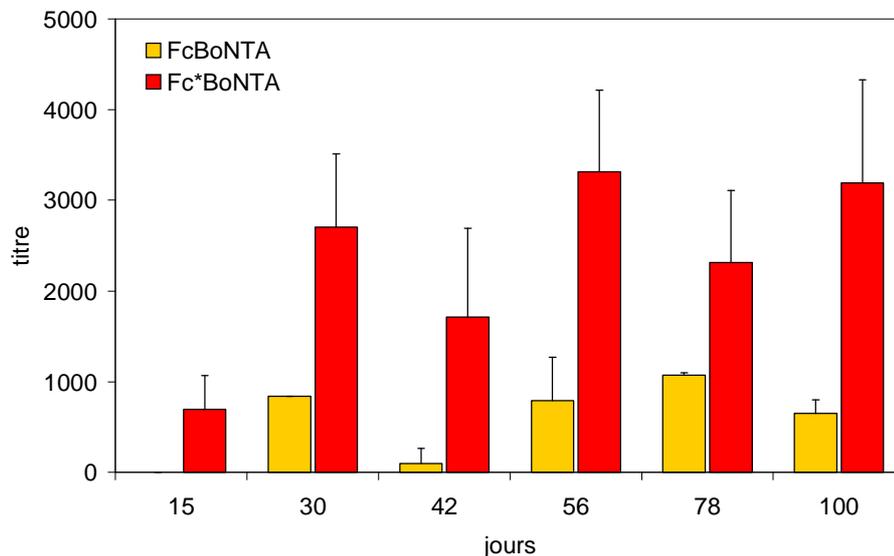


FIG. 3.20 – *Intérêt de la séquence optimisée.*

On observe des titres significativement plus élevés avec la construction Fc*BoNTA dont la séquence a été optimisée pour une expression maximale, qu'avec la construction FcBoNTA. En effet les titres obtenus avec le fragment non optimisé FcBoNTA se situent autour de 1000, alors

qu'avec la séquence optimisée Fc*BoNTA les titres en anticorps atteignent 3000. On observe par ailleurs que le titre en anticorps se maintient au cours du temps avec un titre en moyenne aussi élevé à 100 jours qu'à 30 jours.

Cette expérience a été répétée une deuxième fois, et le profil obtenu est exactement le même avec un gain du titre en anticorps avec la séquence optimisée pour l'usage des codons. Cette stratégie d'optimisation de codons a montré son efficacité. Ce résultat confirme ce que de nombreuses études ont montré [195,340] : il faut atteindre une valeur seuil d'expression de l'antigène pour pouvoir induire une réponse humorale [93].

Le titre en anticorps nous donne une information sur la quantité d'anticorps produits et donc présents dans le sérum des souris. Cependant il est indispensable de réaliser un test de neutralisation pour évaluer réellement le pouvoir neutralisant de ces anticorps vis-à-vis de la neurotoxine botulique A entière (tabl 3.3).

Condition	Dilutions				Titre neutral. pour 10MLD
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
FcBoNTA	2/2	0/2	0/2	0/2	100
Fc*BoNTA	2/2	0/2	0/2	0/2	100

TAB. 3.3 – *Test de neutralisation contre la toxine botulique A : apport de l'optimisation de codons.* Les résultats correspondent au nombre de souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés.

Le titre en anticorps neutralisants est de 100 pour les deux sérums testés. Ce titre est faible, mais surtout on ne voit pas de différence entre la condition optimisée et celle non optimisée. Le titre en anticorps était pourtant plus élevé dans la condition optimisée. Ce résultat confirme qu'il est indispensable de tester le pouvoir neutralisant d'un sérum car la quantité d'anticorps dans ce sérum ne suffit pas pour évaluer la qualité d'un sérum.

Apport d'un signal de sécrétion

De nombreuses études ont montré qu'un des paramètres cruciaux pour une immunisation par ADN efficace est la forme et la localisation cellulaire de l'antigène [348]. Diverses réponses immunes efficaces ont été obtenues contre des protéines virales transmembranaires (protéine G du virus de la rage) [349], sécrétées (antigène de surface du virus de l'hépatite B) [350] ou cytoplasmiques (protéine interne du virus de l'influenza A) [174]. Nous avons donc évalué dans notre cas l'ajout d'un signal de sécrétion sur le fragment immunogène. Pour cela les plasmides pVaxFc*BoNTA, pVaxFc*BoNTA-Master et pVaxFc*BoNTA-Variant sont injectés et électrotransférés et le titre en anticorps des différents lots est comparé (figure 3.21).

En comparant les titres en anticorps obtenus dans les différents lots de souris traitées avec le fragment Fc*BoNTA ne possédant pas de signal de sécrétion ou avec les fragments Fc*BoNTA-Master/Variant possédant chacun un signal de sécrétion différent, on n'observe pas de différence significative entre les lots. Les titres en anticorps sont supérieurs à 2000 dans les trois lots et relativement stables au cours du temps pendant les 6 mois de la cinétique.

Nous avons réalisé un test de neutralisation sur les sérums prélevés 6 semaines (J42) après le début du traitement pour évaluer le pouvoir neutralisant des anticorps anti-FcBoNTA obtenus dans les différents cas testés (tableau 3.4).

On observe un titre en anticorps neutralisant très élevé de 10 000 dans le sérum des souris traitées avec le plasmide pVaxFc*BoNTA-Master, possédant le signal de sécrétion de l'Epo. Ce

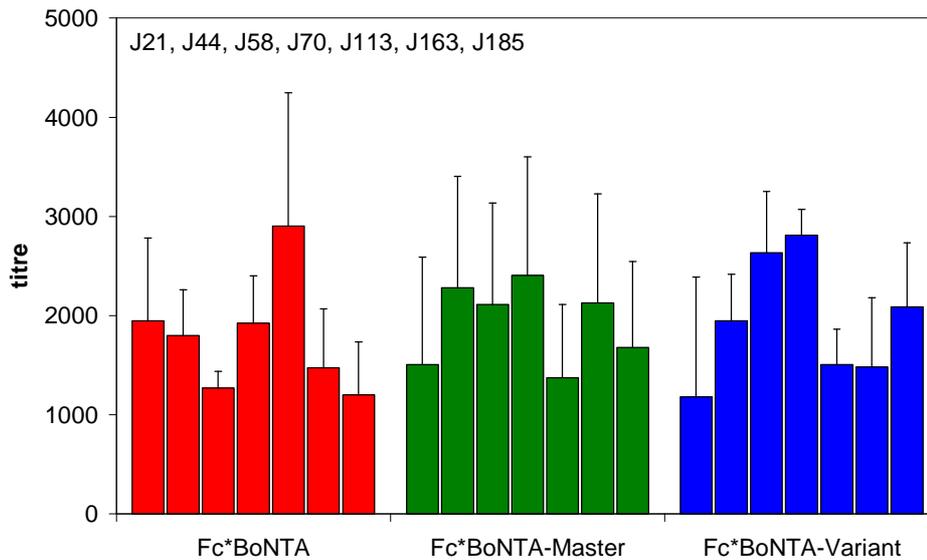


FIG. 3.21 – *Comparaison des titres obtenus avec ou sans signal de sécrétion.*

Condition	Dilutions				Titre neutral. pour 10MLD
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
Fc*BoNTA	2/2	0/2	0/2	0/2	100
Fc*BoNTA-Master	2/2	2/2	2/2	0/2	10 000
Fc*BoNTA-Variant	2/2	1/2	0/2	0/2	100-1000

TAB. 3.4 – *Test de neutralisation contre la toxine botulique A : apport du signal de sécrétion.* Les résultats correspondent au nombre de souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés.

titre de 10 000 obtenu est encourageant. A titre de comparaison, l'équipe du Dr. Michel Popoff à l'Institut Pasteur, a récemment obtenu un titre de 8 000 chez la souris après trois injections de $10\mu\text{g}$ de protéine recombinante Hc purifiée, et un titre de 20 000 chez le lapin après trois injections de $100\mu\text{g}$ de protéine recombinante Hc purifiée [351]. Par contre pour le sérum des souris traitées avec le plasmide pVaxFc*BoNTA-Variant, possédant le signal de sécrétion de la hSeAP, le titre est faible, à peine supérieur à celui des souris traitées avec le plasmide pVaxFc* sans signal de sécrétion. Nous n'avons pas d'explication à cette différence entre les deux signaux de sécrétion. On peut supposer que les protéines ne se replient pas de la même façon selon le signal de sécrétion et donc conduisent à la production d'anticorps dirigés contre des épitopes différents plus ou moins efficaces.

Ce titre élevé obtenu avec la condition Fc*BoNTA-Master est obtenu à J42. Nous effectuons un nouveau test de neutralisation pour étudier le pouvoir neutralisant de ce sérum au cours du temps. En effet, le titre en anticorps est relativement stable au cours du temps (figure 3.21), il est donc intéressant de voir si ce sérum reste neutralisant. Nous réalisons ce test de neutralisation sur les sérums du lot Fc*BoNTA-Master prélevés à J21, J58, J86, J113, J163 et J185 après le début du traitement pour évaluer le pouvoir neutralisant des anticorps anti-FcBoNTA obtenus dans les différents cas testés (tableau 3.5).

Condition	Dilutions			Titre neutral. pour 10MLD
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
J21	0/2	0/2	0/2	<1000
<i>J44</i>	<i>2/2</i>	<i>2/2</i>	<i>0/2</i>	<i>10000</i>
J58	2/2	0/2	1/2	>1000
J86	2/2	1/2	1/2	1000-10 000
J113	2/2	1/2	1/2	1000-10 000
J163	2/2	1/2	2/2	1000-10 000
J185	2/2	0/2	0/2	1000

TAB. 3.5 – *Test de neutralisation sur les sérums du lot Fc*BoNTA-Master au cours du temps.* Les résultats correspondent au nombre de souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés. Pour référence, la conditions Fc*BoNTA-Master à J42 déjà obtenue précédemment est placée en italique.

Le titre neutralisant est relativement stable au cours du temps : en effet, au moins jusqu'à 163 jours après une seule injection et électrotransfert, le titre se maintient entre 1000 et 10 000. Il faut cependant noter que ces résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de souris par condition. En effet, nous avons effectué tous nos tests avec deux souris par dilution pour limiter le nombre de souris, mais ce nombre restreint nous conduit à des difficultés d'interprétation lorsque par exemple à J163 une souris sur deux est vivante à la dilution 10⁻⁴ et les deux sont vivantes à la dilution 10⁻⁵. De même à J113, une souris sur deux est vivante à ces mêmes dilutions. Dans ces deux cas nous avons décidé de placer le titre neutralisant entre 1000 et 10 000. Cette étude nous permet cependant de conclure que globalement les anticorps produits par la souris après injection et électrotransfert du fragment immunogène Fc*BoNTA sécrété ont un pouvoir neutralisant satisfaisant.

Les cellules musculaires ne peuvent présenter des antigènes à leur surface par des molécules de classe II du CMH et ne peuvent donc pas stimuler les cellules T CD4+. Une des voies possibles d'activation de ces cellules T pourrait faire intervenir la libération des antigènes ou de fragments antigéniques par les cellules musculaires transfectées conduisant à leur capture et présentation par des cellules présentatrices d'antigène présentes recrutées sur le lieu de l'injection. Si un tel mécanisme joue un rôle dans l'immunisation par ADN, on peut s'attendre à ce que une protéine sécrétée soit plus efficace pour générer de grandes quantités d'antigène

3.8 Optimisation du protocole

Nous avons optimisé le fragment immunogène, mais il est également possible d'optimiser le protocole de traitement lui-même. Nous avons donc testé différents paramètres : l'effet de l'électrotransfert, l'effet d'un prétraitement à la hyaluronidase, le choix du tissu cible pour l'électrotransfert (intradermique ou intramusculaire) et le nombre d'injections.

Là encore, toutes les expériences suivantes ont été réalisées selon le même protocole que précédemment, sauf indication contraire.

Intérêt de l'électrotransfert

Le but de ce projet est d'examiner le potentiel de l'électrotransfert d'ADN plasmidique pour l'obtention d'anticorps neutralisants à haut titre. Nous avons donc réalisé un essai pour valider

l'intérêt de l'électrotransfert : pour cela nous avons comparé une injection seule ou une injection combinée à un électrotransfert, et ces deux protocoles ont été étudiés sur les plasmides pVaxFcBoNTA et pVaxFc*BoNTA (figure 3.22).

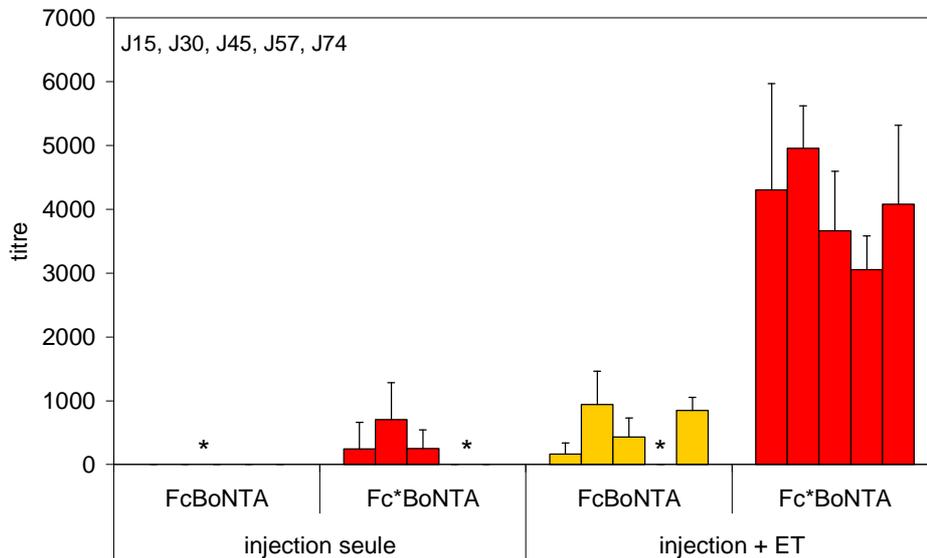


FIG. 3.22 – *Comparaison injection seule / injection + électrotransfert*. L'astérisque signifie que le titre en anticorps est inférieur à 100.

En comparant les titres obtenus après injection du plasmide pVaxFcBoNTA (non optimisé) suivi ou non d'un électrotransfert, on constate que chez les souris sans électrotransfert, tout au long de l'étude, on ne détecte pas d'anticorps à la plus faible dilution effectuée ($1/100^e$) alors que pour les souris traitées par une injection suivie d'un électrotransfert, on observe un titre autour de 1000.

En comparant de la même façon les titres en anticorps obtenus avec pVaxFc*BoNTA en injection seule ou combiné à un électrotransfert, on observe une augmentation significative d'un facteur 4 du titre en anticorps grâce à l'électrotransfert.

Condition	Dilutions				Titre neutral. pour 10MLD
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
injection seule	0/2	0/2	0/2	0/2	<100
injection + ET	2/2	1/2	0/2	0/2	100-1000

TAB. 3.6 – *Test de neutralisation contre la toxine botulique A : apport de l'électrotransfert*. Les résultats correspondent au nombre de souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés.

Les titres neutralisants obtenus (tableau 3.6) avec le sérum des souris ayant été injectées et électrotransférées avec le plasmide pVaxFc*BoNTA sont semblables à ceux obtenus précédemment dans les mêmes conditions (tableau 3.3) autour de 100. Par contre, le sérum des souris traitées en injection seule, n'est pas neutralisant. Ce résultat n'est pas surprenant puisque le titre en anticorps est très faible. Nous confirmons grâce à cette étude, l'intérêt de l'électrotransfert

qui permet d'augmenter fortement la production d'anticorps par rapport à une injection seule d'ADN et permet ainsi d'avoir des sérums à plus haut titre en anticorps neutralisants.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cet effet de l'électrotransfert [96]

- **augmentation de l'expression d'antigène** : l'électrotransfert permet d'augmenter l'expression d'un transgène par rapport à une injection seule or la production d'anticorps est proportionnelle à la quantité d'antigènes présentés. Le niveau d'expression de l'antigène est le paramètre critique pour l'obtention d'anticorps neutralisants [93].
- **augmentation de la transfection de cellules présentatrices d'antigène** : il est possible que lors de la transfection du muscle, certaines cellules présentatrices d'antigène (APC) soient également transfectées induisant ainsi une réponse immune. Or, nous savons que l'électrotransfert permet d'augmenter le nombre de cellules musculaires transfectées donc par la même occasion l'électrotransfert permettrait d'augmenter la probabilité de transférer des APC.
- **réponse inflammatoire** : l'inflammation causée par l'électrotransfert amplifie la réponse immunitaire. En effet Babiuk et al. ont montré que l'application d'impulsions électriques une heure avant l'injection du plasmide n'augmente pas l'expression du gène mais augmente la réponse immunitaire par rapport à l'injection seule de plasmide sans prétraitement [334].

Le mécanisme par lequel l'électroporation amplifie la réponse immune serait donc une combinaison d'une augmentation de l'expression de l'antigène au niveau des cellules du muscle et éventuellement des cellules présentatrices d'antigène, et une augmentation de l'inflammation induisant une infiltration cellulaire.

3.8.1 Effet de la hyaluronidase

La hyaluronidase est une enzyme responsable de la dégradation de l'acide hyaluronique, constituant majeur de la matrice extracellulaire du muscle. Nous avons montré qu'un prétraitement du muscle tibial cranial par la hyaluronidase permet d'augmenter fortement l'expression d'une protéine d'intérêt (voir chapitre 1, paragraphe 1.6). Il semble donc intéressant de tester un tel prétraitement avant l'injection et électrotransfert de plasmide codant le fragment C-terminal de la toxine botulique A. Nous avons vu que le fragment optimisé Fc*BoNTA conduit à des titres plus élevés que le fragment natif FcBoNTA. Nous décidons donc de tester l'effet de la hyaluronidase sur ces deux constructions.

Pour cela, nous injectons 25 μ l de hyaluronidase (0,4 U/ μ l) dans le muscle tibial cranial de deux lots de souris. Deux heures après ce prétraitement, un lot est injecté et électrotransféré avec le plasmide pVaxFcBoNTA et l'autre lot est traité avec le plasmide pVaxFc*BoNTA. Ces lots de souris sont comparées à deux lots de souris traitées de la même façon mais sans le prétraitement à la hyaluronidase (figure 3.23).

Chez les souris traitées avec le plasmide pVaxFcBoNTA on observe une nette amélioration du titre en anticorps lors d'un prétraitement à la hyaluronidase : sans prétraitement le titre est inférieur à 1000, avec un prétraitement à la hyaluronidase, le titre atteint 3000 à 45 jours puis diminue pour se maintenir au dessus de 1000 à 100 jours.

Chez les souris traitées avec le plasmide optimisé pVaxFc*BoNTA, cette amélioration est beaucoup plus nuancée. En effet sans prétraitement les souris ont déjà un titre en anticorps autour de 3000, et l'ajout du prétraitement à la hyaluronidase permet d'augmenter légèrement ce titre vers 4000 mais avec des variations plus importantes entre les souris.

Nous avons également testé l'effet de la hyaluronidase dans le cas du pVaxFc*BoNTA-Master. En effet ce fragment nous a donné un titre en anticorps neutralisant élevé, il est donc intéressant de voir si ce titre peut être encore augmenté par ce prétraitement (figure 3.24). Nous n'avons

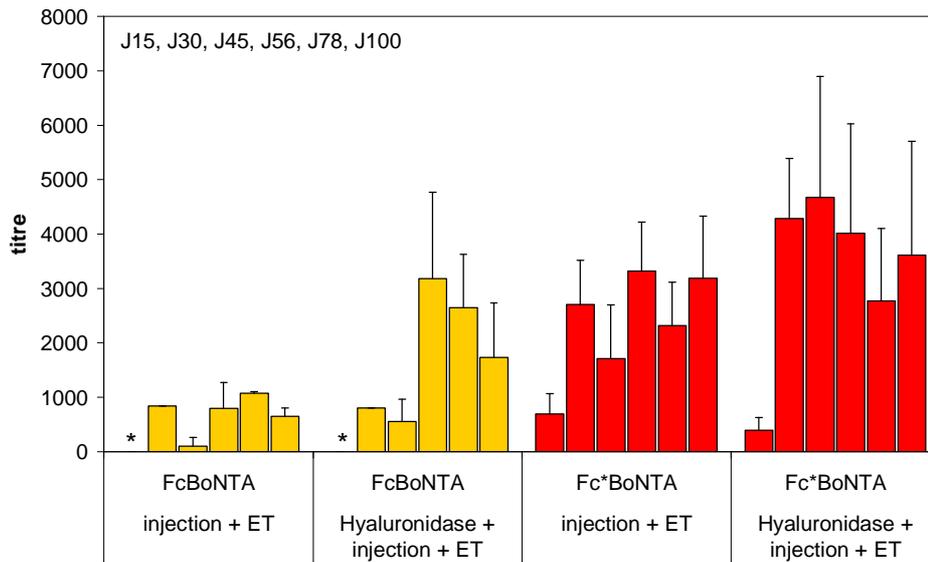


FIG. 3.23 – Comparaison des titres en anticorps obtenus avec ou sans prétraitement à la hyaluronidase. L'astérisque signifie que le titre en anticorps est inférieur à 100.

pas étudié avec un gène rapporteur l'effet d'un prétraitement à la hyaluronidase sur une protéine sécrétée, mais ce point a été montré récemment par Fattori et al. avec la SeAP [352] : ils ont observé un gain d'environ un facteur 10 du taux de protéine circulante dans le sérum.

Nous avons représenté sur cette figure les titres en anticorps obtenus dans la condition pVaxFc*BoNTA-Master sans hyaluronidase de la figure 3.21 pour pouvoir évaluer l'effet de la hyaluronidase.

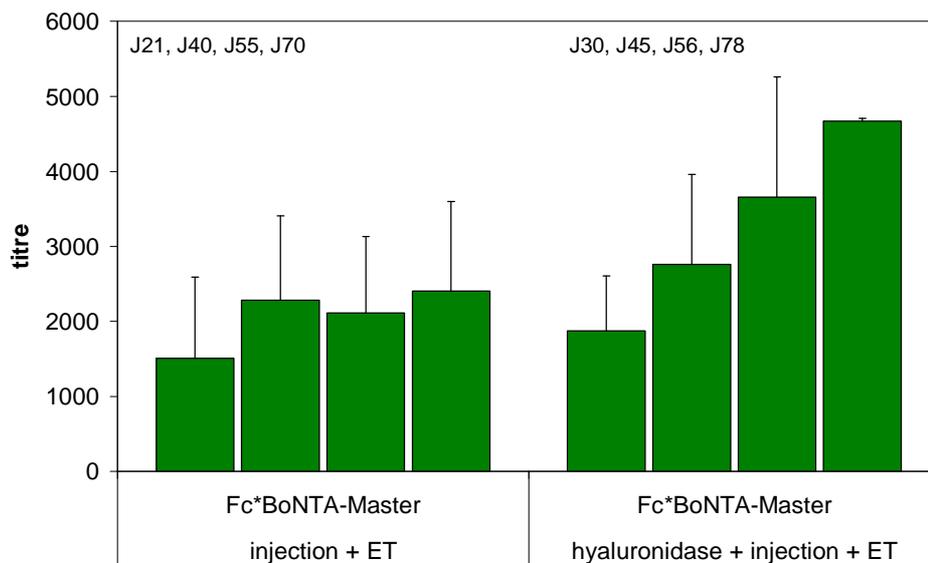


FIG. 3.24 – Comparaison des titres obtenus avec ou sans prétraitement à la hyaluronidase avec le plasmide pVaxFc*BoNTA-Master.

En comparant les titres en anticorps obtenus dans les deux lots traités ou non à la hyaluronidase, on observe une augmentation progressive du titre en anticorps dans le cas d'un prétraitement. Ce titre obtenu reste sensiblement comparable à celui de la condition Fc*BoNTA avec traitement à la hyaluronidase (figure 3.23).

Nous avons ensuite évalué le titre neutralisant de ces différents sérums (tableau 3.7).

Condition	Hyalu.	Dilutions				Titre neutral. pour 10MLD
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
Fc*BoNTA	NON	2/2	0/2	0/2	0/2	100
Fc*BoNTA	OUI	2/2	2/2	0/2	0/2	1000
<i>Fc*BoNTA-Master</i>	<i>NON</i>	<i>2/2</i>	<i>2/2</i>	<i>2/2</i>	<i>0/2</i>	<i>10 000</i>
Fc*BoNTA-Master	OUI	2/2	2/2	1/2	0/2	1000-10 000

TAB. 3.7 – **Test de neutralisation contre la toxine botulique A : apport de la hyaluronidase.** Les résultats correspondent au nombre de souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés. Pour référence, la condition Fc*BoNTA-Master sans hyaluronidase déjà obtenue précédemment est placée en italique.

Si l'on compare les titres neutralisants des sérums des souris injectées avec le plasmide pVaxFc*BoNTA, on observe une légère amélioration du titre pour les souris prétraitées à la hyaluronidase. Par contre dans le cas du fragment Fc*BoNTA-Master, on n'observe pas d'amélioration du titre neutralisant. Là encore il faut noter que ce test de neutralisation avec 2 souris par dilution nous donne une indication mais devrait être confirmé sur un plus grand nombre de souris.

Un prétraitement à la hyaluronidase peut donc être intéressant pour augmenter la réponse immune, en particulier, cette stratégie devrait être testée sur de plus gros animaux pour lesquels une transfection efficace est plus difficile [192].

Dans notre projet on cherche à avoir la quantité maximale d'anticorps à haut titre neutralisant, mais dans le cadre d'une vaccination génétique, il faudrait être prudent avec l'utilisation de la hyaluronidase. En effet, Barry et al. ont suggéré que si la réponse immune de type cellulaire est trop importante (générée par exemple par des quantités importantes d'ADN plasmidique, ou éventuellement dans notre cas par ce prétraitement), les cellules transfectées sont détruites trop tôt pour maintenir une stimulation immune efficace [353].

3.8.2 Electrotransfert intradermique

La peau, barrière naturelle de défense de l'organisme, est un organe de choix pour l'immunisation génétique : c'est un tissu facilement accessible, qui contient des cellules présentatrices d'antigène, et qui peut jouer un rôle d'organe de sécrétion (pour plus de détails, voir l'introduction et le chapitre 1). En effet, en transfectant les cellules de la peau, et plus particulièrement les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques situées dans l'épiderme et le derme, on peut parvenir à une réponse immunologique efficace [152]. Par ailleurs, il faut noter que les cellules de la peau ont une courte durée de vie, ce qui permet dans le cas de stratégies de vaccination par ADN, de s'affranchir des risques potentiellement nocifs liés à un transfert de gène à long terme (intégration, mutation insertionnelle). Inversement un transfert en intradermique, n'aura d'utilité que pour des applications nécessitant un traitement à court terme [111].

Pavselj et al. ont récemment montré un transfert de gène efficace dans la peau après injection en intradermique et électrotransfert (combinaison d'une impulsion HV et d'une impulsion LV)

avec une expression de luciférase maintenue pendant 10 jours environ. Nous avons montré précédemment qu'il était possible d'avoir expression d'un transgène pendant environ deux semaines après injection et électrotransfert en intradermique (figure 1.13, chapitre 1).

Nous comparons donc un traitement en intradermique à un traitement en intramusculaire avec le plasmide pVaxFc*BoNTA (dans 30 μ l NaCl en intramusculaire et dans 100 μ l NaCl en intradermique). Les conditions d'électrotransfert sont les mêmes pour les deux tissus cibles car nous avons montré une bonne efficacité de transfert de gène dans la peau dans ces conditions (figure 1.13 chapitre 1), à savoir : 8 impulsions de 200V/cm d'une durée de 20ms et d'une fréquence de 2Hz.

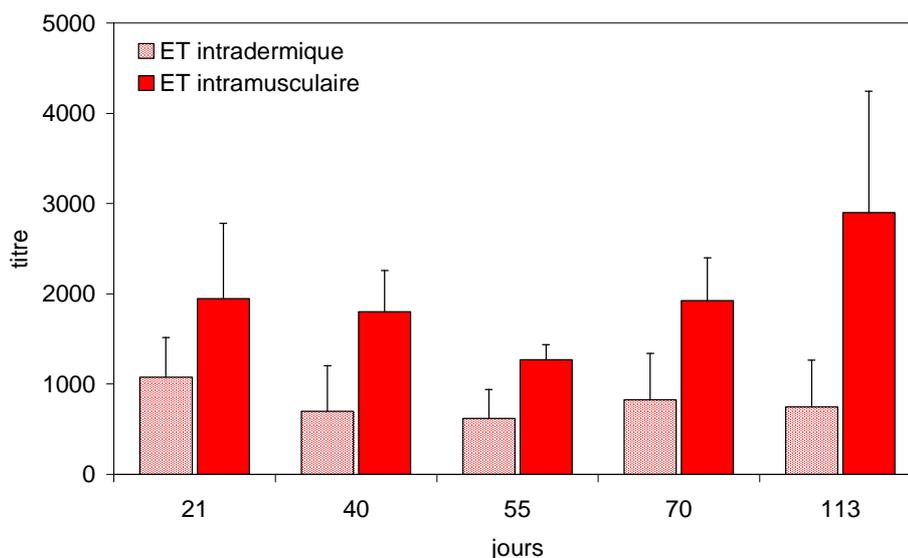


FIG. 3.25 – *Comparaison des titres en anticorps obtenus en intradermique ou intramusculaire avec le plasmide pVaxFc*BoNTA.*

En comparant les deux lots traités avec le même plasmide pVaxFc*BoNTA en intradermique ou en intramusculaire (figure 3.25), on observe un titre en anticorps plus élevé en intramusculaire d'environ un facteur 2 par rapport à l'intradermique. Cependant ce résultat est encourageant pour l'électrotransfert en intradermique puisqu'on a vu précédemment que l'expression d'un transgène est plus faible en intradermique qu'en intramusculaire.

Condition	Dilutions				Titre neutral. pour 10MLD
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
intradermique	0/2	0/2	0/2	0/2	<100
intramusculaire	2/2	0/2	0/2	0/2	100

TAB. 3.8 – *Test de neutralisation contre la toxine botulique A : apport d'un électrotransfert en intradermique ou en intramusculaire avec le plasmide pVaxFc*BoNTA.* Les résultats correspondent au nombre de souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés.

Les anticorps obtenus après injection et électrotransfert du plasmide pVaxFc*BoNTA en intradermique ne sont pas neutralisant (tableau 3.8). En effet, même à la dilution 10⁻² les souris

ne survivent pas après l'injection de la toxine. Cependant nous n'avons testé dans ce premier essai que la construction pVaxFc*BoNTA qui possède le fragment C-terminal optimisé de la toxine mais sans signal de sécrétion. Nous réalisons donc un nouvel essai en intradermique avec le plasmide pVaxFc*BoNTA-Master (voir paragraphe suivant).

3.8.3 Injections multiples

Nous avons testé également différents protocoles d'injection. En effet, lors de la première évaluation réalisée avec le plasmide pVaxFcBoNTA, nous avons réalisé une combinaison d'injection à trois semaines d'intervalle, mais cet essai ne nous avait pas permis de conclure sur une éventuelle efficacité (figure 3.11).

Combinaison intradermique et/ou intramusculaire et effet dose

Nous avons testé l'effet d'une combinaison de deux injections à trois semaines d'intervalle, la première injection étant réalisée en intradermique ou en intramusculaire. Cette étude est réalisée uniquement avec le plasmide pVaxFc*BoNTA-Master qui possède le signal de sécrétion de l'Epo. Nous avons également, lors de cette comparaison, testé deux autres quantités de plasmides (20 et 80 μ g). Nous avons donc comparé (figure 3.26) 6 lots de souris traitées par injection et électrotransfert de :

- pVaxFc*BoNTA-Master en intradermique (id.) à J0
- pVaxFc*BoNTA-Master en intramusculaire (im.) à J0
- pVaxFc*BoNTA-Master (20 μ g) en intramusculaire à J0
- pVaxFc*BoNTA-Master (80 μ g, soit 40 μ g par muscle) en intramusculaire à J0
- pVaxFc*BoNTA-Master en intramusculaire à J0 et à J21 (im. + im.)
- pVaxFc*BoNTA-Master en intradermique à J0 et en intramusculaire à J21 (id. + im.)

Lorsque la quantité d'ADN n'est pas précisée, 40 μ g ont été injectés.

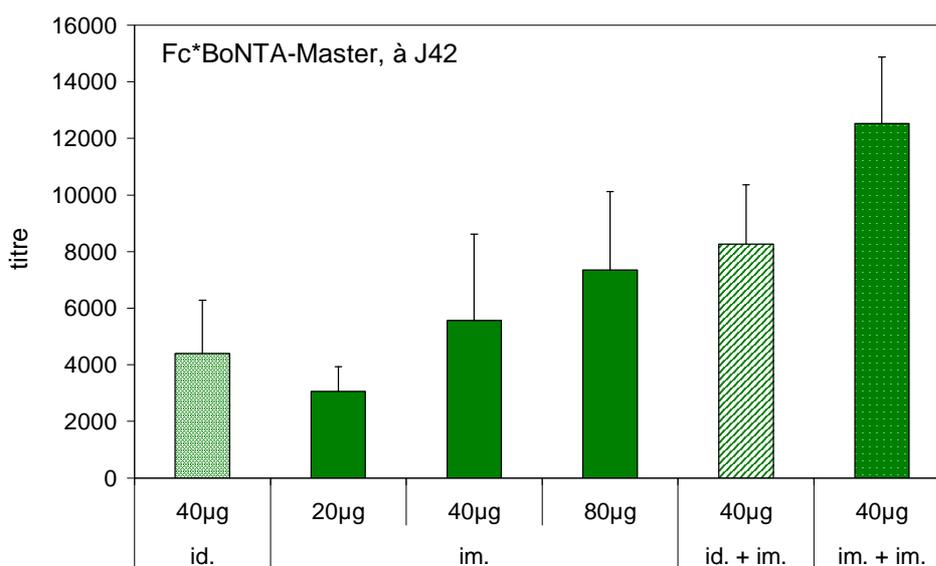


FIG. 3.26 – *Comparaison des titres en anticorps obtenus en combinant des injections en intradermique et/ou intramusculaire*

Si l'on compare les titres en anticorps obtenus selon les doses injectées en intramusculaire (im., 20, 40 et 80 μ g d'ADN) on observe que le titre en anticorps augmente proportionnellement à la dose d'ADN injectée. Il faut préciser que dans le cas de 80 μ g, l'ADN a été injecté en deux sites distincts. Ce protocole semble intéressant et devra être évalué plus en détail.

En analysant les titres en anticorps obtenus dans chaque lot traité avec 40 μ g, on observe du point de vue du protocole, que l'injection en intradermique est moins efficace que l'injection en intramusculaire qui est moins efficace que la combinaison intradermique et intramusculaire qui est moins efficace que deux injections en intramusculaire. Il faut cependant noter que les titres obtenus en intradermique avec le pVaxFc*BoNTA-Master sont assez proche de ceux obtenus en intramusculaire. L'écart observé avec le pVaxFc*BoNTA précédemment (figure 3.25) n'est plus tellement visible. On observe également que les titres obtenus après deux injections (que la première soit en intradermique ou en intramusculaire) sont beaucoup plus élevés qu'après une seule injection.

Les protocoles classiques d'immunisation avec une protéine recombinante font intervenir plusieurs injections ou «boost». Ces réinjections permettent de réactiver le système immunitaire une fois que la protéine a été éliminée. Dans notre cas, les cellules musculaires sont capables de sécréter une protéine pendant plusieurs mois [76], donc il n'était pas évident qu'une réinjection soit nécessaire. Ce protocole de réinjection devra être confirmé mais semble intéressant.

Il aurait été intéressant de tester plusieurs injections en intradermique également. Pavselj et al. ont en effet montré une réponse immune efficace après une injection et électrotransfert en intradermique suivie de un ou deux «boost» à deux semaines d'intervalle [112]. Cette combinaison devra être testée.

Deux traitements à un mois d'intervalle

Nous avons testé l'effet d'une réinjection à un mois d'intervalle avec le fragment Fc*BoNTA non sécrété. Pour cela deux lots de souris sont injectés et électrotransférés avec 40 μ g de plasmide pVaxFc*BoNTA à J0 et un des deux lots est à nouveau traité un mois après le premier traitement avec 40 μ g de plasmide pVaxFc*BoNTA (figure 3.27).

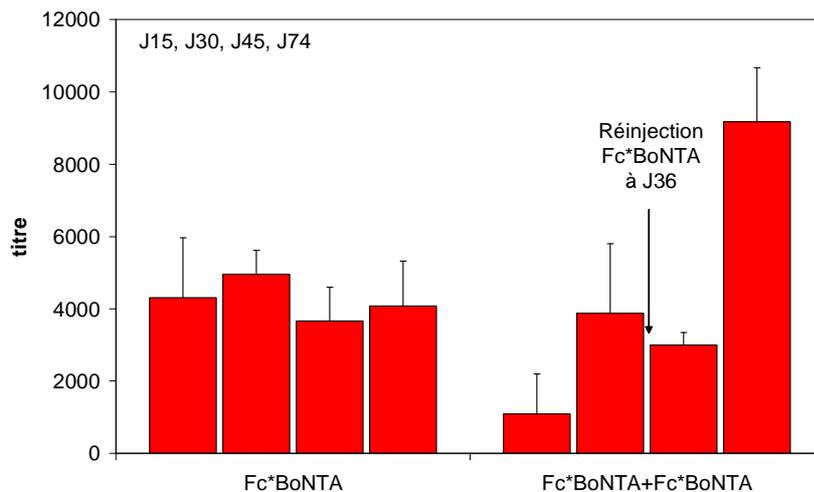


FIG. 3.27 – *Effet d'un second électrotransfert 36 jours après le premier traitement.*

On observe une nette augmentation du titre en anticorps dans le lot de souris traitées deux

fois à un mois d'intervalle. Ce résultat a été obtenu très récemment et devra donc être testé à nouveau éventuellement avec le plasmide pVaxFc*BoNTA-Master. En effet il sera intéressant de savoir si c'est l'intervalle entre les deux injections qui a de l'importance ou la localisation de l'antigène dans notre cas.

Test de neutralisation

Nous avons réalisé un test de neutralisation sur les sérums prélevés 6 semaines après le début du traitement pour évaluer le pouvoir neutralisant des anticorps anti-FcBoNTA obtenus dans différents cas testés.

Nous avons regroupé les sérums des 4 souris de chaque lot : pVaxFc*BoNTA-Master en intradermique puis intramusculaire 3 semaines après, pVaxFc*BoNTA-Master deux fois en intramusculaire à 3 semaines d'intervalle, pVaxFc*BoNTA deux fois en intramusculaire à un mois d'intervalle.

Le tableau 3.9 présente les souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés.

Condition	Dilutions				Titre neutral. pour 10MLD
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
<i>Fc*BoNTA-Master i.m</i>	2/2	2/2	2/2	0/2	10 000
Fc*BoNTA-Master i.d + i.m	2/2	1/2	0/2	1/2	?
Fc*BoNTA-Master i.m+i.m	2/2	2/2	1/2	1/2	1000-10 000
<i>Fc*BoNTA i.m</i>	2/2	0/2	0/2	0/2	100
Fc*BoNTA i.m + i.m	2/2	2/2	1/2	1/2	1000-10 000

TAB. 3.9 – **Test de neutralisation contre la toxine botulique A : effet de deux électrotransfert successifs.** Les résultats correspondent au nombre de souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés. Pour référence, les conditions *Fc*BoNTA-Master i.m* et *Fc*BoNTA i.m* déjà obtenues précédemment sont placées en italique.

Ces résultats ne nous permettent pas vraiment de conclure sur le protocole optimal. Les résultats ne sont pas exploitables puisque par exemple pour la condition id. + im. les deux souris de la dilution 10^{-4} sont mortes et une souris sur deux est vivante à la dilution 10^{-5} . De plus nous n'avons pas pu tester la condition Fc*BoNTA-Master en intradermique car nous n'avions pas assez de sérum. Ce test de neutralisation va être renouvelé sur un plus grand nombre de souris. Cependant on peut observer que la réinjection à un mois d'intervalle du pVaxFc*BoNTA permet d'augmenter le pouvoir neutralisant des anticorps. En effet nous n'avions qu'un titre de 100 après une injection et électrotransfert. Avec deux injections, on atteint au moins un titre de 1000 et une souris sur deux survit à la dilution 10^{-4} et 10^{-5} . Ce protocole de réinjection semble donc être intéressant.

3.9 Caractérisation des antisérums

Les sous types de réponse immune médiés par les cellules T helper sont bien compris et bien définis chez la souris. Une réponse immune de type Th1 est principalement une réponse cellulaire, elle est caractérisée par la forte présence d'anticorps IgG2a et la production de cytokines IFN γ et TNF α . Une réponse immune de type Th2 est principalement une réponse humorale avec

production d'anticorps, elle est caractérisée par la forte présence d'anticorps IgG1 et la production de cytokines IL-4 et IL-10 [343].

Pour définir de façon plus précise le type de réponse immunitaire généré dans les différents lots de souris nous réalisons donc deux ELISA en parallèle pour détecter au sein d'un sérum les anticorps de type IgG1 ou IgG2a et ainsi déterminer le profil d'IgG dans les différents sérums. Différentes conditions sont testées pour comparer les différents antigènes produits (sécrétés ou non), les différents protocoles d'électrotransfert (intradermique ou intramusculaire), l'effet d'un prétraitement à la hyaluronidase et de la réinjection. Nous avons dosé les sérums des lots traités avec les plasmides pVaxFcBoNTA (noté Fc), pVaxFc*BoNTA (Fc*), pVaxFc*BoNTA-Master (Fc*M), pVaxFc*BoNTA-Variant (Fc*V), pVaxFc*BoNTA+hyaluronidase (HFc*) au temps J42 après le début de l'expérience. En contrôle nous avons dosé un sérum de souris injectée trois fois avec la protéine recombinante FcBoNTA (sérum fourni par l'Institut Pasteur) (figure 3.28).

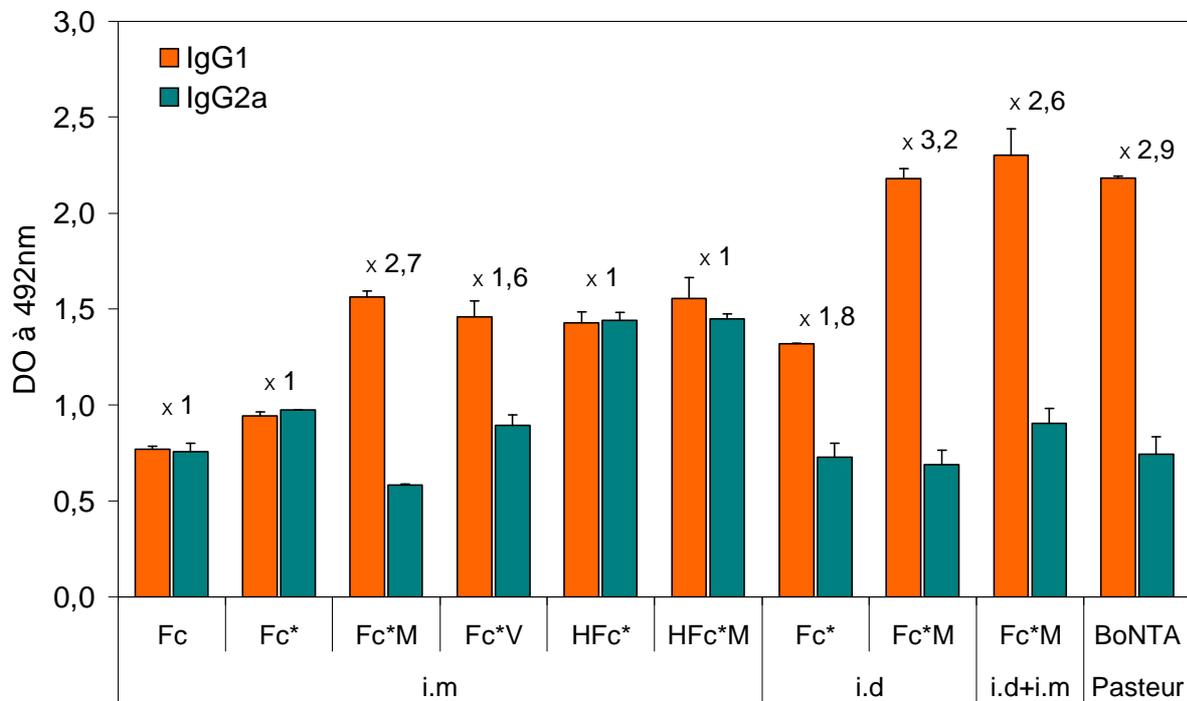


FIG. 3.28 – **Rapport IgG1/IgG2a.** Les sérums de chaque lot sont regroupés et dosés en triplicate, à la dilution $1/100^e$ pour la détection des anticorps IgG1 et IgG2a. Le rapport IgG1/IgG2a est indiqué sur le graphe.

Pour les sérums Fc et Fc* dans le cas d'une injection et électrotransfert en intramusculaire, le rapport IgG1/IgG2a est proche de 1. L'ADN plasmidique code dans ce cas une protéine cytoplasmique (figure 3.17 d'immunofluorescence). La réponse semble être à la fois cellulaire et humorale.

Pour les sérums Fc*M et Fc*V dans le cas d'une injection et électrotransfert en intramusculaire, le rapport IgG1/IgG2a est proche de 2. L'ADN plasmidique code dans ce cas une protéine sécrétée : l'antigène circule donc dans l'organisme. On se retrouve donc dans une situation mimant la vaccination protéique : nous avons d'ailleurs dosé en parallèle un sérum de souris immunisées par des injections de protéine recombinante (fourni par le laboratoire du Dr. M. Popoff), le rapport IgG1/IgG2a est sensiblement le même. L'antigène extracellulaire serait donc

pris en charge par des cellules présentatrices d'antigène qui le présentent sur des molécules de classe II du CMH, ce qui aboutit à une forte réponse humorale. Plusieurs études comparant différentes formes d'antigène (sécrété, cytoplasmique ou membranaire) ont montré que la localisation cellulaire de l'antigène influait sur le type de réponse immune : ces études montrent en particulier que la forme sécrétée conduit à une forte réponse de type Th2 caractérisée par la présence essentiellement d'IgG1 [183,354].

Si l'on ajoute un prétraitement à la hyaluronidase, cet effet n'est plus visible. Le rapport IgG1/IgG2a est proche de 1 que l'antigène soit sécrété (Fc*M) ou non (Fc*). Si l'on compare les conditions Fc*M et HFc*M (sécrété, avec ou sans hyaluronidase), on observe que la quantité d'IgG1 ne varie pas, par contre la quantité d'IgG2a augmente avec le prétraitement à la hyaluronidase. On peut supposer en effet, que dans le cas de ce prétraitement, la réponse cellulaire cytotoxique soit plus importante du fait de la dégradation de la matrice extracellulaire du tissu. C'est sans doute pour cela que nous avons observé une augmentation du titre en anticorps dans le cas d'un prétraitement à la hyaluronidase avec le plasmide pVaxFc*BoNTA-Master (figure 3.24), mais que ces anticorps n'avaient pas un pouvoir neutralisant supérieur (figure 3.7). Par contre, pour la condition HFc*, le rapport est toujours de 1 mais les quantités d'IgG1 et d'IgG2a ont augmenté de façon proportionnelle. Les anticorps dans la condition HFc* avaient effectivement un pouvoir neutralisant plus important que la condition Fc* (figure 3.7).

Dans le cas d'un électrotransfert en intradermique, on observe un rapport IgG1/IgG2a bien supérieur à 1, même dans le cas où l'antigène est cytoplasmique (Fc*). Dans leur étude d'immunisation génétique, Pavselj et al. n'ont détecté aucun sous-type IgG2a ni IgG2b après injection et électrotransfert en intradermique d'un plasmide codant l'ovalbumine, suggérant une réponse uniquement de type Th2 [112].

Dans le cas d'une réinjection (Fc*M id+im), on observe là encore un rapport proche de 3.

Les deux dernières conditions (Fc*M id ou Fc*M id+im) semblent donc très intéressantes dans le cadre de notre projet : la réponse immune est essentiellement humorale avec des titres en anticorps élevés. Le test de neutralisation sur ces conditions sera réévalué prochainement.

Gronevik et al. ont très récemment montré que l'électrotransfert semblait favoriser une réponse de type Th1 [355]. Pour vérifier cela, ils ont injecté et électrotransféré un vecteur d'expression codant un antigène sous contrôle d'un promoteur régulable par la tétracycline pour retarder l'expression de l'antigène un mois après l'application des impulsions électriques. Dans le cas d'une expression retardée de l'antigène, ils ont observés des niveaux d'IgG2a fortement diminués (caractéristiques d'une réponse cellulaire Th1), alors que les niveaux d'IgG1 (caractéristiques d'une réponse humorale Th2) ne sont pas affectés. L'électroporation semble donc jouer un rôle d'adjuvant pour promouvoir une réponse de type Th1. Effectivement dans notre cas, pour l'ensemble des conditions, la quantité d'IgG2a est globalement stable et non négligeable. Elle est maximale dans le cas d'un prétraitement à la hyaluronidase. Par contre, la quantité d'IgG1 est très différente selon que l'antigène est sécrété ou non et selon le protocole d'injection. Cette analyse pourra nous aider à définir de façon plus précise le protocole optimal.

3.10 Antisérums anti-BoNTB et anti-BoNTE

Au vu des résultats encourageants obtenus avec le fragment C-terminal de la toxine botulique A, nous avons réalisé la même étude sur les fragments C-terminaux des toxines botuliques B et E qui touchent également l'homme (étude réalisée avec Myriam Mezzrahi et Elodie Litzler au cours de leur stage de DEA). Le but de cette étude est d'une part de valider la production d'anticorps anti-FcBoNTB et anti-FcBoNTE de la même façon qu'avec la toxine botulique A, et d'autre part de comparer les résultats obtenus avec ces différentes toxines pour confirmer le protocole expérimental et les constructions plasmidiques optimales pour l'obtention d'antisérums à hauts titres.

3.10.1 Construction et validation du matériel génétique de départ

Les différentes séquences codantes construites sont représentées figure 3.29.

Nous disposons des plasmides pCR2.1-FcToxB et pCR2.1-FcToxE (fournis par l'Institut Pasteur) contenant respectivement les fragments C-terminaux de la toxine botulique B et E, notés FcBoNTB et FcBoNTE. Le fragment FcBoNTE est inséré dans le vecteur d'expression eucaryote pVax2 sous contrôle d'un promoteur CMV. Le plasmide obtenu est noté pVaxFcBoNTE. La construction du plasmide pVaxFcBoNTB est encore en cours.

En parallèle nous avons également optimisé la séquence des deux fragments FcBoNTB et FcBoNTE pour une expression maximale chez la souris en remplaçant les codons usuels de *Clostridium botulinum* par ceux utilisés chez *Mus musculus*. Les fragments optimisés ont été synthétisés par la société Geneart après ajout du signal de sécrétion de l'érythropoïétine de souris et de la séquence Kozak.

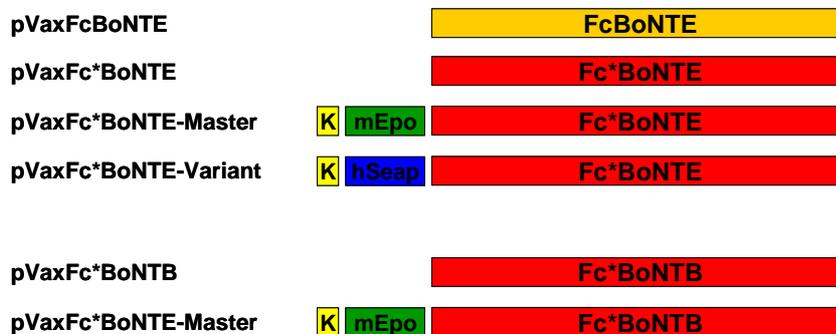


FIG. 3.29 – Schéma des séquences codantes avec les fragments C-terminaux de la toxine B et E.

Les fragments Fc*BoNTB-Master et Fc*BoNTE-Master, issus respectivement des plasmides 042870pPCR-Script et 042869pPCR-Script (Geneart), sont insérés dans le vecteur d'expression eucaryote pVax2 sous contrôle du promoteur CMV. Ces fragments contiennent les fragments optimisés C-terminaux des toxines botuliques B et E (Fc*BoNTB et Fc*BoNTE), précédés du signal de sécrétion de l'érythropoïétine de souris et d'un signal Kozak gccacc. Les plasmides correspondants sont notés pVaxFc*BoNTB-Master et pVaxFc*BoNTE-Master.

Le plasmide pVaxFc*BoNTE-Variant possédant le fragment Fc*BoNTE précédé du signal de sécrétion de la phosphatase alcaline humaine sécrétée, est également construit.

Enfin, à partir de ces plasmides, nous avons également construit les plasmides pVaxFc*BoNTB et pVaxFc*BoNTE en retirant le signal de sécrétion.

La fonctionnalité des plasmides est vérifiée par transfection transitoire sur des cellules de mélanomes de souris B16. Une RT-PCR spécifique à partir de l'ARN extrait du lysat cellulaire nous permet de détecter les transcrits des fragments FcBoNTB et FcBoNTE (figure 3.30).

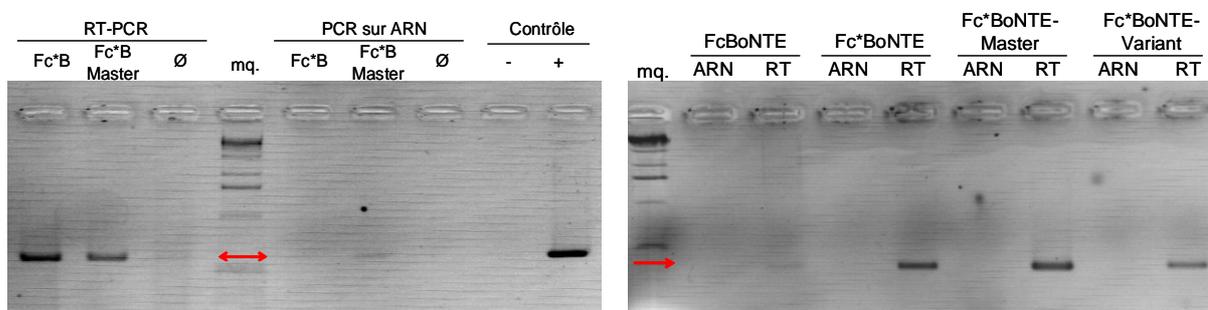


FIG. 3.30 – *Analyse par RT-PCR de la présence du transcrite correspondant au fragment FcBoNTB et FcBoNTE dans le lysat cellulaire après transfection.* RT-PCR : Fc*BoNTB : amorce sens : 5'gagcaacatcgaggagcgg3', amorce antisens : 5'ctgcaggtgcagcccagct3' (600pb), FcBoNTE : amorce sens : 5'atgcgatcatcaagagcagcagc3', amorce antisens : 5'gatgtaatcgctgatgccgttg3' (429pb), Fc*BoNTE amorce sens : 5'atgagaattaaaagttagttcagtt3', amorce antisens : 5'tataatcagaataccatttgc3' (427pb). Notations : mq : marqueur de taille 1kb; ∅ : contrôle cellules non transfectées; Contrôle - : PCR sans ADN; Contrôle + : PCR sur le plasmide correspondant. En contrôle, une PCR est effectuée directement sur les ARN extraits avant RT des différentes conditions.

Nous ne disposons pas d'anticorps monoclonaux anti-FcBoNTB et anti-FcBoNTE pour valider ces plasmides au niveau traductionnel (détection de la protéine). Nous avons tout de même testé les plasmides *in vivo* sur des souris SWISS.

3.10.2 Etude *in vivo*

Nous réalisons un essai pour vérifier qu'il est possible, comme avec la toxine A, d'obtenir des anticorps anti-FcBoNTB et anti-FcBoNTE par injection et électrotransfert. Par la même occasion nous allons comparer l'efficacité des différentes constructions pour valider les résultats obtenus avec la toxine A (figure 3.31).

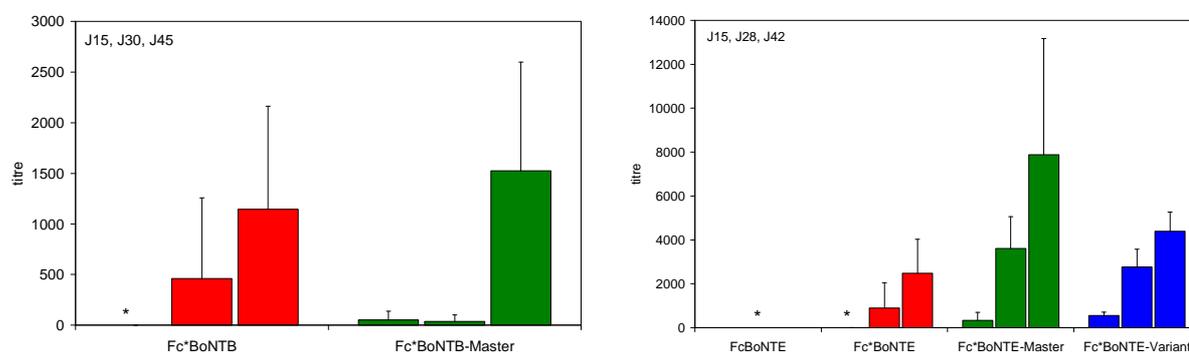


FIG. 3.31 – *Antisérums anti-FcBoNTB et anti-FcBoNTE : comparaison des différentes constructions plasmidiques.* L'astérisque signifie que le titre en anticorps est inférieur à 100.

Ce premier essai nous permet tout d'abord de montrer qu'il est possible d'obtenir des anti-

corps anti-FcBoNTB et antiFcBoNTE après injection et électrotransfert d'un plasmide codant le fragment C-terminal de la toxine botulique B ou E.

En comparant les titres obtenus avec les plasmides pVaxFcBoNTE et pVaxFc*BoNTE, on constate que chez les souris traitées avec le plasmide pVaxFcBoNTE, même à 42 jours, on ne détecte pas d'anticorps à la plus faible dilution effectuée ($1/100^e$) alors que chez les souris traitées avec le plasmide pVaxFc*BoNTE, à 42 jours le titre en anticorps est supérieur à 2000. Cela semble confirmer la nécessité de l'optimisation des codons pour la production d'anticorps anti-FcBoNTE.

En comparant les titres obtenus avec les plasmides pVaxFc*BoNTE et pVaxFc*BoNTE-Master/Variant, on constate que l'ajout d'un signal de sécrétion provoque une augmentation du titre en anticorps. Globalement l'ajout d'un signal de sécrétion permet d'augmenter le titre en anticorps d'un facteur compris entre 2 et 4. Avec les plasmides pVaxFc*BoNTB et pVaxFc*BoNTB-Master, on observe des grandes variations de réponse entre les souris : plus précisément pour une souris dans chacun des deux lots on ne détecte pas d'anticorps à la plus faible dilution effectuée ($1/100^e$) alors que les autres souris des mêmes lots ont des titres supérieurs à 1000. Au vu de ces résultats, on ne peut pas conclure sur l'intérêt ou non du signal de sécrétion dans le cas de la toxine B. L'expérience devra être testée à nouveau pour confirmer les résultats.

Si l'on compare maintenant les titres obtenus avec les plasmides pVaxFc*BoNTE-Master et pVaxFc*BoNTE-Variant, possédant respectivement le signal de sécrétion de l'érythropoïétine de souris ou de la phosphatase alcaline sécrétée humaine, on constate que les titres en anticorps à J42 sont plus élevés chez les souris traitées avec le plasmide pVaxFc*BoNTE-Master que chez celles traitées avec le pVaxFc*BoNTE-Variant. Cependant il faut noter que chez les souris traitées avec le plasmide pVaxFc*BoNTE-Master on observe à 42 jours une grande variation du titre selon les souris : plus précisément une souris a un titre vers 16 000 alors que les trois autres ont un titre entre 3 et 6 000. Chez les souris traitées avec le plasmide pVaxFc*BoNTE-Variant, l'écart entre les titres est plus faible avec globalement un titre vers 4 000.

Ces sérums devront être testés pour évaluer leur pouvoir neutralisant.

3.11 Sérums multivalents

A terme, il sera indispensable de disposer d'antisérums multivalents capables de neutraliser plusieurs toxines en même temps. Nous savons que la co-injection et électrotransfert de plusieurs plasmides dans le muscle tibial cranial est réalisable et conduit à l'expression des différents gènes (voir chapitre 2 et [296]). Il semble donc intéressant d'étudier si la co-injection de plusieurs plasmides codant plusieurs antigènes conduit à un sérum multivalent ayant un haut titre en anticorps neutralisants chaque toxine. Nous avons montré qu'il est possible d'obtenir séparément des anticorps anti-FcBoNTA, anti-FcBoNTB et anti-FcBoNTE après injection et électrotransfert des plasmides correspondants. Nous avons choisi le plasmide possédant le signal de sécrétion de l'Epo qui donnait les meilleurs résultats en neutralisation pour la toxine A. Nous réalisons donc un essai en co-injectant $40\mu\text{g}$ de chaque plasmide pVaxFc*BoNTA-Master, pVaxFc*BoNTB-Master et pVaxFc*BoNTE-Master. Concrètement nous injectons dans chaque patte de la souris $60\mu\text{g}$ d'un mélange des trois plasmides. (figure 3.32).

Cet essai nous permet de conclure qu'il est possible d'obtenir des sérums multivalents après injection et électrotransfert de trois plasmides codant chacun un antigène différent. Les titres obtenus pour les trois toxines sont du même ordre de grandeur vers 1500 bien qu'ils soient difficilement comparables puisque le test ELISA est différent pour chaque fragment.

Pour évaluer si ce titre en anticorps multivalents est comparable à celui obtenu en monovalent, nous avons reporté dans le tableau 3.10 les valeurs obtenues à J45 pour chaque toxine. Il ne

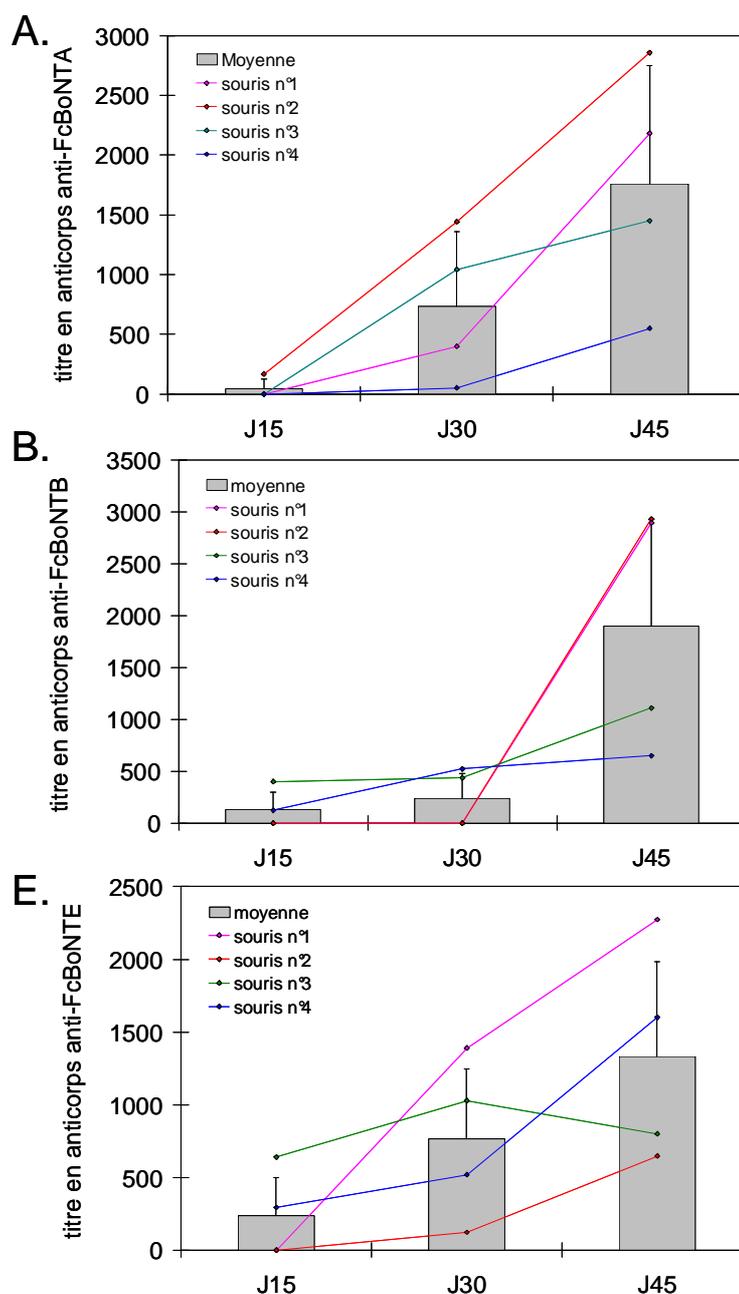


FIG. 3.32 – *Titres en anticorps anti-FcBoNTA (A.), anti-FcBoNTB (B.) et anti-FcBoNTE (E.) après co-injection des 3 plasmides pVaxFc*BoNT-Master respectifs (multivalent). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD des titres obtenus pour chaque souris ($n=4$), le titre en anticorps de chaque souris est également représenté.*

semble pas y avoir de différence significative entre les titres en anticorps obtenus après injection et électrotransfert de chaque plasmide seul (monovalent) ou en co-injection (multivalent) sauf pour le fragment FcBoNTE dont le titre en anticorps est supérieur lorsque le monovalent est injecté.

Il faut s'assurer que les anticorps des sérums multivalents sont au moins aussi neutralisants

Fragment	Titre en anticorps à J42	
	monovalent	multivalent
toxine A	2280 ± 1122	1759 ± 990 ^{N.S}
toxine B	1526 ± 1072	1898 ± 1029 ^{N.S}
toxine E	7876 ± 5294	1330 ± 654 ^{**}

TAB. 3.10 – *Comparaison des titres en anticorps obtenus lors d'une co-injection (multivalent) ou lors d'une injection simple (monovalent) des plasmides pVaxFc*BoNT-Master correspondant pour chaque toxine. Les valeurs des titres correspondent à la moyenne ± SD des titres de chaque lot (n=4). Notations des statistiques (test ANOVA) : différence significative avec ** p<0,01, N.S non significatif*

que les anticorps des sérums monovalents, sinon une telle stratégie ne présente pas d'intérêt. Nous avons effectué uniquement le test de neutralisation contre la toxine A (tableau 3.11) car les stocks de toxine B et E sont actuellement en cours d'évaluation à l'Institut Pasteur.

Condition	Dilutions				Titre neutral. pour 10MLD
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
monovalent	2/2	2/2	1/2	0/2	1000-10000
multivalent	2/2	1/2	0/2	0/2	100-1000

TAB. 3.11 – *Test de neutralisation contre la toxine botulique A : comparaison d'un sérum monovalent ou multivalent. Les résultats correspondent au nombre de souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés.*

Le sérum multivalent est moins neutralisant que le sérum monovalent. Il est donc possible d'obtenir des sérums multivalents par co-injection de plusieurs plasmides mais ce sérum semble être moins efficace du point de vue de la neutralisation. Nous n'avons pour l'instant effectué uniquement le test de neutralisation contre la toxine A, les tests devront être également réalisés sur les toxines B et E, mais ce premier résultat semble indiquer qu'il n'est pas forcément intéressant de co-injecter plusieurs plasmides : un mélange de sérums monovalent pourrait être aussi intéressant. Ce point devra être étudié.

Sedegah et al. ont récemment montré que la co-injection de 9 plasmides codant 9 antigènes de *Plasmodium falciparum* conduisait à une diminution considérable de la réponse immune d'un facteur allant de 8 à 2500 fois comparé à une simple injection [356].

Plusieurs hypothèses de mécanisme peuvent être proposées pour cette diminution : nous avons montré précédemment *in vitro* (chapitre 2) que lorsque l'on co-transfecte trois plasmides, toutes les cellules transfectées n'internalisent pas forcément les trois plasmides ou du moins n'expriment pas forcément les trois gènes correspondants. On peut donc supposer qu'en co-injectant plusieurs plasmides codant plusieurs antigènes différents, le nombre de cellules exprimant un antigène en particulier sera inférieur aux nombres de cellules exprimant ce même antigène lorsque le plasmide correspondant est injecté seul. Si moins de cellules expriment cet antigène, la réponse immune contre cet antigène sera moins forte. Un deuxième mécanisme possible serait une compétition au niveau de la transcription ou de la traduction au sein d'une même cellule. Il serait intéressant de doser les protéines FcBoNTA, FcBoNTB et FcBoNTE sécrétées dans le sérum des souris dans les différents cas pour évaluer ce point. Un troisième mécanisme serait une compétition au niveau des voies de présentation de l'antigène.

Il pourrait être intéressant de tester l'injection de ces trois plasmides sur des sites d'injection distincts, pour s'affranchir de ces éventuels mécanismes de compétitions au niveau d'une même cellule cible.

3.12 Application de la technique au lapin

3.12.1 Choix du protocole

Différents protocoles d'électrotransfert chez le lapin sont cités dans la littérature, avec chaque fois des conditions différentes d'électrotransfert (tableau 3.12). Nous avons choisi notre protocole sur la base de ces différents exemples (tableau 3.12 en italique) en utilisant des électrodes aiguilles conçues par la société Sphergen : elles sont constituées de trois aiguilles alignées (figure 3.33), celle du milieu est utilisée pour l'injection à 5mm de profondeur et constitue ensuite l'électrode négative, les deux extérieures servent d'électrodes positives.

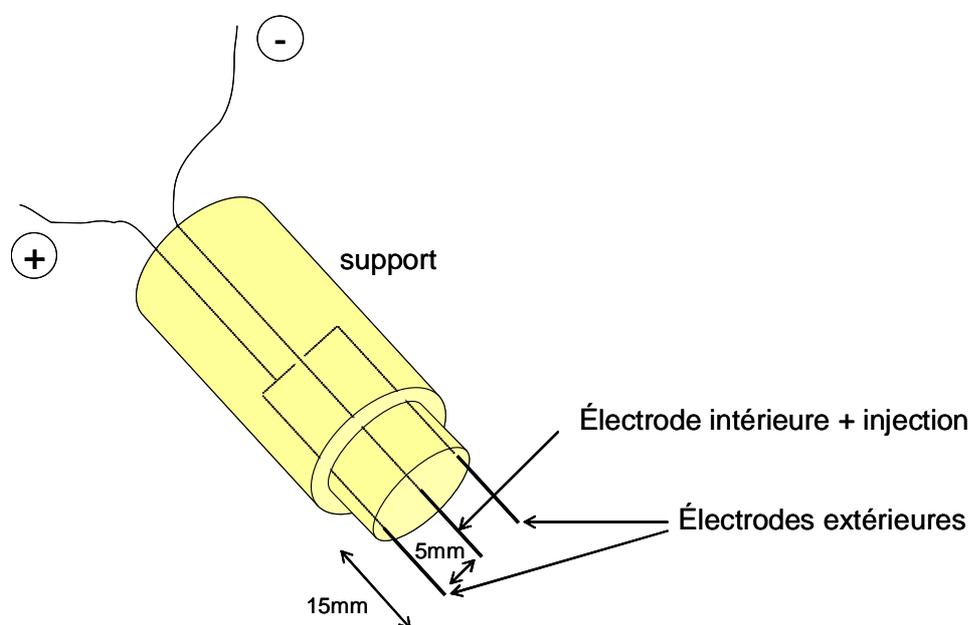


FIG. 3.33 – *Électrodes Sphergen utilisées pour l'électrotransfert chez le lapin.*

Muscle	ADN		Conditions	Ref.
	μg	μl		
gracilis	500-1000	900	200V/cm ; 6 impulsions ; 50ms ; 1Hz	[96]
fémoral	500	300	50V/cm ; 3+3 impulsions ; 10ms ; 1Hz	[357]
tibialis	200	200	90V/cm ; 1000 impulsions bipolaires ; 10 trains ; 1s	[105]
squelettique	100	500	75V/cm ; 3+3 impulsions ; 50ms ; 1Hz	[358]
tibialis	300-3000	300	90V/cm ; 1000 impulsions bipolaires ; 8 trains ; 1s	[352]
<i>fémoral</i>	<i>500</i>	<i>300</i>	<i>125V/cm ; 8 impulsions ; 20ms ; 2Hz</i>	<i>Nous</i>

TAB. 3.12 – *Différentes conditions d'électrotransfert dans le muscle chez le lapin.*

3.12.2 Réalisation

Nous avons réalisé un essai sur deux lapins mâles néo-zélandais, nommés Mystère et Bouldegomme, pour comparer une injection et électrotransfert (Mystère) à une injection seule (Bouldegomme). Le lapin Bouldegomme est injecté directement avec 500 μ g de plasmide pVaxFc*BoNTA-Master dans 300 μ l de NaCl 0,9% dans le muscle fémoral sans anesthésie. Le lapin Bouldegomme est anesthésié à l'aide d'un mélange kétamine/xylazine en intramusculaire, puis sa patte arrière est rasée, et 500 μ g de plasmide pVaxFc*BoNTA-Master dans un volume de 300 μ l sont injectés également. Puis les électrodes sont appliquées au niveau du site de l'injection pour délivrer le champ électrique.

Des prélèvements de sang sont effectués régulièrement dans l'artère de l'oreille et le titre en anticorps des deux lapins est déterminé à chaque temps par dosage des anticorps dans le sérum grâce à un ELISA (figure 3.34).

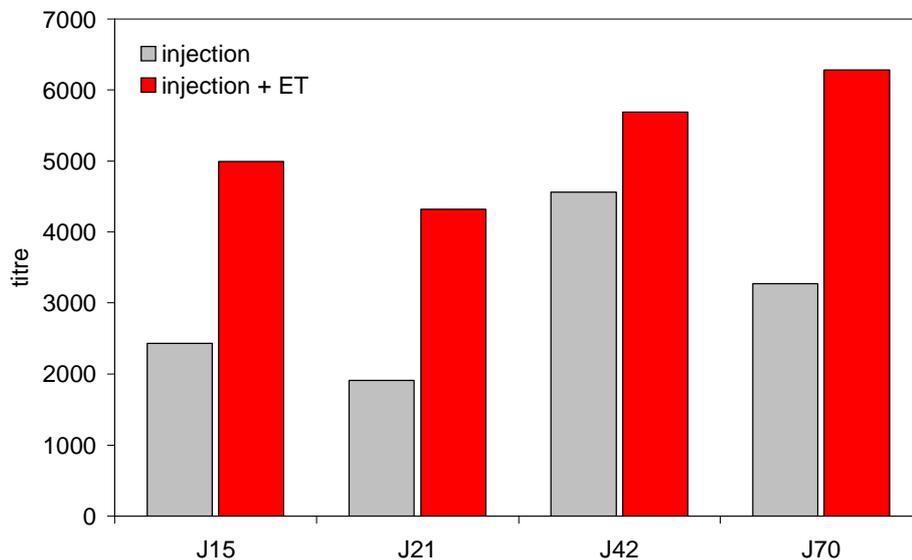


FIG. 3.34 – *Titres en anticorps obtenus chez le lapin après une injection seule ou combinée avec un électrotransfert.* Le lapin Mystère (rouge) est injecté et électrotransféré avec 100 μ g de plasmide pVaxFc*BoNTA-Master. Le lapin Bouldegomme (gris) reçoit une injection seule de 100 μ g du même plasmide.

Cet essai nous permet de montrer qu'il est également possible d'obtenir des anticorps anti-FcBoNTA chez le lapin. Au vu des résultats l'électrotransfert semble améliorer légèrement la production d'anticorps, mais ce résultat ne nous permet pas vraiment de conclure sur l'efficacité de l'électrotransfert dans notre cas car nous n'avons travaillé que sur deux lapins.

Nous effectuons un test de neutralisation sur les sérums des deux lapins 6 semaines (J42) après le début de l'expérience (tableau 3.13).

Ce test de neutralisation nous permet de conclure qu'il est possible d'obtenir des anticorps neutralisants par injection d'ADN codant l'antigène correspondant chez le lapin, par contre les titres obtenus sont très faibles. A titre de comparaison, l'équipe du Dr. Michel Popoff à l'Institut Pasteur, a récemment obtenu un titre de 20 000 chez le lapin après trois injections de 100 μ g de protéine recombinante Hc purifiée [351]. Il sera nécessaire de vérifier l'efficacité de notre protocole d'électrotransfert chez le lapin en étudiant les niveaux d'expression d'un gène

Condition	Dilutions				Titre neutral. pour 10MLD
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
Mystère (inj+ET)	2/2	0/2	0/2	0/2	100
Bouldegomme (inj)	1/2	1/2	1/2	0/2	?

TAB. 3.13 – *Test de neutralisation contre la toxine botulique A : preuve du concept chez le lapin et comparaison injection/ injection et électrotransfert.* Les résultats correspondent au nombre de souris survivantes injectées par BoNTA et neutralisées par les sérums testés.

rapporteur. On pourra également réaliser un essai en intradermique sur le lapin : Medi et al. ont récemment montré un transfert efficace dans la peau en utilisant des électrodes plaques [359]. Il sear intéressant également de tester l'effet d'une réinjection.

3.13 Conclusion et Perspectives

3.13.1 Remarques générales

Les résultats présentés dans ce travail s'appuient sur des expériences réalisées avec seulement 4 souris par condition pour les traitements *in vivo* et deux souris par dilution sur les test de neutralisation : en effet vu le nombre important de constructions et de protocoles à tester, nous avons préféré limiter le nombre d'animaux dans cette première étape d'évaluation. Ce nombre est sans doute insuffisant pour tirer des conclusions définitives mais il nous permet cependant de dégager des tendances pour nous focaliser par la suite sur les conditions les plus intéressantes.

De nombreuses expériences complémentaires devront être réalisées pour confirmer ou clarifier certains résultats. Ces expériences n'ont pas encore été effectuées par manque de temps.

3.13.2 Bilan

Ces premières expériences nous ont permis de dégager un certain nombre d'informations :

- Il est possible d'obtenir des anticorps anti-toxine botulique **A, B et E** par injection et électrotransfert **intramusculaire** chez la souris d'un plasmide codant le fragment C-terminal immunogène correspondant.
- Il est possible d'obtenir des anticorps anti-toxine botulique **A** par injection et électrotransfert **intradermique** chez la souris d'un plasmide codant le fragment C-terminal immunogène correspondant.
- Les anticorps anti-toxine A obtenus sont **neutralisants**.
- L'**électrotransfert** permet d'améliorer la production d'anticorps par rapport à une injection seule.
- L'**optimisation** de la séquence de l'antigène selon l'usage des codons chez la souris permet d'augmenter l'expression de l'antigène et par conséquent la réponse immunitaire correspondante.
- L'ajout d'un **signal de sécrétion** n'améliore pas la production d'anticorps mais les anticorps obtenus semblent avoir un meilleur pouvoir neutralisant. Le titre en anticorps neutralisants obtenu est comparable à celui obtenu après trois injections de protéine recombinante. Cependant le choix du signal de sécrétion a son importance. Nous n'avons pas les mêmes résultats avec deux signaux de sécrétion différents.

- Un prétraitement à la **hyaluronidase** permet d'augmenter la production d'anticorps surtout lorsque l'antigène est faiblement exprimé. Cependant ce prétraitement semble promouvoir principalement une réponse de type Th1.
- **Deux traitements** successifs (injection + électrotransfert) à 3 semaines ou un mois d'intervalle ou une double injection en deux sites distincts à J0 permettent d'améliorer le titre en anticorps obtenu, que l'antigène soit sécrété ou non. Le pouvoir neutralisant de ces sérums devra être évalué de façon plus précise.
- Il est possible d'obtenir des **sérums multivalents** anti-toxine A, B et E par co-injection des différents plasmides codant les fragments C-terminaux respectifs de ces toxines, mais une première évaluation semble montrer une moins bonne efficacité de neutralisation.
- Il est possible d'obtenir des anticorps anti-toxine botulique **A** par injection seule ou combinée à l'électrotransfert **intramusculaire** chez le **lapin** d'un plasmide codant le fragment C-terminal immunogène correspondant. Le protocole n'est cependant pas optimisé.

3.13.3 Perspectives

Le protocole optimal sera sans doute une combinaison des protocoles testés jusqu'à présent : il pourrait ressembler à une double injection de 40 μ g de plasmide pVaxFc*BoNTA ou pVaxFc*BoNTA-Master à J0 dans chaque muscle, une réinjection à un mois d'intervalle, et éventuellement un «boost» protéique un mois après pour augmenter encore la réponse immune.

D'autres paramètres pourront également être évalués, comme la co-injection de cytokines ou la comparaison de différents signaux de sécrétion.

Nous savons en effet que la co-injection suivie d'un électrotransfert de plusieurs plasmides en intramusculaire permet une co-expression au niveau du muscle des différentes protéines d'intérêt. Il peut donc être intéressant de co-injecter le plasmide codant l'antigène et un plasmide codant une cytokine qui permettrait d'améliorer la réponse humorale. Cette étude est actuellement en cours au laboratoire.

Par ailleurs, nous avons observé une différence significative entre les titres en anticorps neutralisants obtenus avec le signal de sécrétion de l'Epo et celui de la hSeAP. Nous essayons actuellement de déterminer la quantité de FcBoNTA sécrété dans le sérum dans chaque cas par dosage ELISA. Il serait éventuellement intéressant de tester d'autres signaux de sécrétion, comme par exemple le signal de sécrétion de l'activateur au plasminogène t-PA, qui a été utilisé avec efficacité dans des stratégies d'immunisation génétique dans le muscle [343]. Fattori et al. ont par ailleurs montré une amélioration de l'expression de l'Epo en changeant son signal de sécrétion pour celui du t-PA combiné à une optimisation de codons [352].

Etude de l'état de l'ADN plasmidique après injection et électrotransfert

Sommaire

4.1	Contexte de travail	167
4.2	Détection du plasmide sous forme épisomale	168
4.3	Etude de la possible intégration de l'ADN plasmidique	170
4.4	Etude de l'état de méthylation du promoteur CMV	181
4.5	Conclusions et Perspectives	187

4.1 Contexte de travail

Comme nous l'avons vu au cours de ce travail, le muscle squelettique est un tissu cible très intéressant pour le transfert de gène *in vivo* car il offre de nombreux avantages : le muscle est facilement accessible et de grand volume, il possède une vascularisation développée ce qui permet aux protéines produites d'atteindre rapidement la circulation sanguine, et surtout les fibres musculaires sont quiescentes ce qui permet un maintien du transgène et une expression à long terme.

De nombreuses cinétiques obtenues avec différents gènes rapporteurs ou thérapeutiques peuvent illustrer ce dernier point :

- après injection et électrotransfert sur des souris C57Bl6 de $1\mu\text{g}$ de plasmide codant l'érythropoïétine (mEpo), on observe une augmentation d'hématocrite pendant au moins 100 jours (voir chapitre 2, paragraphe 2.6.4, figure 2.20),
- après injection et électrotransfert de $50\mu\text{g}$ de plasmide pEGFP-C1 (GFP) sur des souris SWISS, on observe une fluorescence des fibres musculaires pendant au moins 169 jours (voir chapitre 1, paragraphe 1.5.2, figure 1.6),
- après injection et électrotransfert de $15\mu\text{g}$ de plasmide codant la phosphatase alcaline sécrétée humaine (hSeAP) sur des souris SCID on observe une expression à long terme pendant au moins un an [145]. Des cinétiques comparables ont été obtenues lors de la mise au point du système de régulation avec la hSeAP également (voir chapitre 2).

Le muscle squelettique est ainsi un organe de choix pour la production en systémique de protéines thérapeutiques. Cependant dans un tel contexte, il est indispensable d'étudier plus précisément les raisons de cette expression à long terme en analysant l'état de l'ADN plasmidique

une fois injecté : s'est-il intégré dans l'ADN génomique, reste-il sous forme épisomale pendant une aussi longue période ?

D'autre part les promoteurs viraux sont souvent utilisés dans le cadre du transfert de gène car ils permettent des niveaux d'expression bien supérieurs à ceux obtenus avec des promoteurs eucaryotes, le plus connu étant celui dérivé du promoteur du cytomegalovirus (CMV). Les cinétiques précédentes par exemple ont été réalisées avec ce promoteur CMV ; or elles montrent un profil analogue : rapidement après injection et électrotransfert, l'expression du transgène augmente fortement, se stabilise pendant une période plus ou moins longue selon les études, puis décroît lentement au cours du temps. Nous avons voulu savoir si cette extinction de l'expression pouvait être due à une méthylation du promoteur CMV.

Ce travail s'articule donc autour de deux questions auxquelles nous avons tenté de répondre : après injection et électrotransfert d'un vecteur plasmidique dans le muscle tibial cranial d'une souris

- quel est l'état de l'ADN plasmidique injecté : reste-t-il sous forme épisomale et/ou est-il intégré dans l'ADN génomique ?
- quel est l'état de méthylation du promoteur CMV de ce vecteur plasmidique, cette méthylation étant une cause possible de l'extinction progressive de l'expression.

4.2 Détection du plasmide sous forme épisomale

Nous souhaitons dans un premier temps étudier l'état d'un vecteur plasmidique après injection et électrotransfert dans le muscle tibial cranial de souris afin de déterminer si plusieurs mois après il est toujours possible de détecter ce vecteur sous forme épisomale. Pour vérifier cette hypothèse nous allons utiliser le fait que les bactéries sont capables d'amplifier un ADN circulaire possédant une origine de réplication bactérienne dès lors que cet ADN a été introduit au sein de la bactérie par transformation. Brièvement nous allons extraire l'ADN total du muscle, puis transformer des bactéries avec cet ADN : l'absence de colonie signifiera qu'aucun plasmide circulaire n'est présent dans l'échantillon, la présence de colonies signifiera que l'on a récupéré du plasmide sous forme épisomale dans l'échantillon.

Pour notre étude nous avons utilisé les muscles de trois cinétiques du projet sur le système de régulation : l'une de 3 mois (85 jours), la deuxième de 12 mois (365 jours) et enfin la troisième de 14 mois (406 jours). Les plasmides injectés et électrotransférés dans les trois cas étaient : 20 μ g de plasmide pXL3010 pour la première et la deuxième cinétique et 20 μ g de plasmide pXL3010 ou pGJA14 ou pGJA15-2 combinés chaque fois à 20 μ g de pTet-tTAk pour la troisième cinétique (voir Résultats sur la régulation figure 2.17). A l'issue de chaque cinétique les muscles ont été prélevés et conservés à -80°C.

L'ADN total d'un muscle de la première cinétique est extrait (figure 4.1A.). Cet ADN total comprend donc l'ADN génomique des cellules musculaires et éventuellement le plasmide pXL3010 circulaire sous forme épisomale que nous avons injecté. Nous avons utilisé la technique d'électroporation pour la transformation car cette technique, qui consiste à utiliser de hauts voltages pour créer des pores transitoires dans la membrane cellulaire des bactéries, permet d'améliorer l'efficacité de transformation par rapport à une transformation par choc thermique classique.

Des bactéries électrocompétentes DH5 α F' ont donc été transformées par électroporation en présence de 1 μ g d'ADN extrait (figure 4.1B.).

Une fois transformées, les bactéries sont étalées sur milieu sélectif LB+Ampiciline. Le plasmide pXL3010 possède le gène de résistance à l'ampiciline, donc seules les bactéries ayant inter-

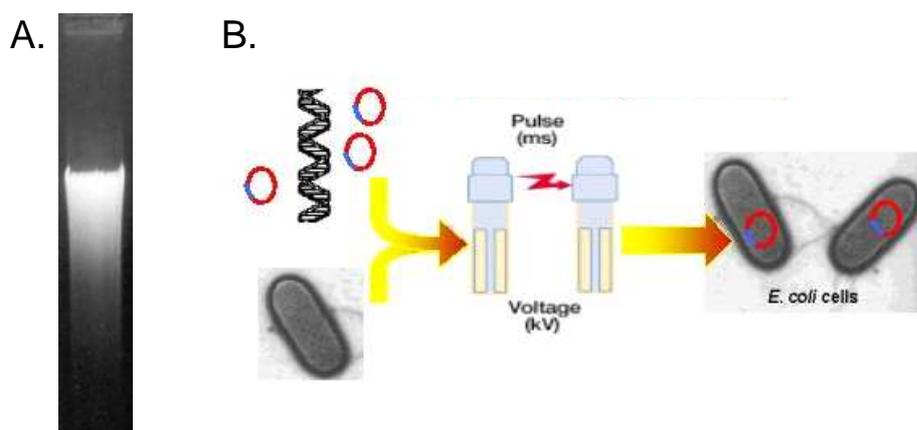


FIG. 4.1 – **Protocole de détection de plasmide sous forme épisomale à long terme.** A. Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN de muscle extrait; B. Protocole d'électroporation : l'ADN extrait ($1\mu\text{g}$ est mis en incubation avec des bactéries DH5 α F' électrocompétentes puis l'électroporation est réalisée (5ms à 2500 volts).

nalisé un plasmide épisomal pourront se développer. Après une nuit à 37°C sur milieu sélectif, environ 50 colonies ont été récupérées et mises en culture une nouvelle nuit à 37°C pour les amplifier. Le lendemain on effectue une minipréparation afin d'extraire l'ADN plasmidique. Les minipréparations positives sont caractérisées par digestion par *ClaI* puis par électrophorèse sur gel d'agarose pour identifier les plasmides récupérés. Le profil attendu de digestion du plasmide pXL3010 par *ClaI* est caractérisé par deux fragments de 3053 et 2356pb. Les résultats de la digestion confirment bien la présence du plasmide pXL3010 (figure 4.2). Grâce à cette expérience nous avons montré qu'il est possible de récupérer du plasmide sous forme épisomale dans l'ADN total extrait d'un muscle 3 mois après injection et électrotransfert.

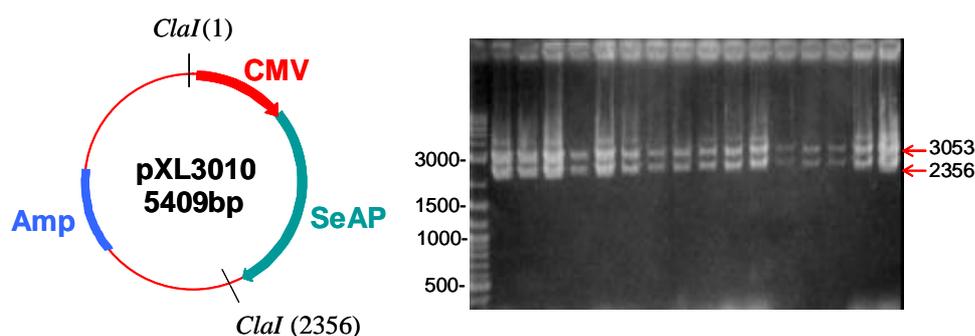


FIG. 4.2 – **Détection de plasmide sous forme épisomale.** Vérification de la nature du plasmide par digestion par l'enzyme de restriction *ClaI* et électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

L'étude a été effectuée également sur les muscles de la troisième cinétique (14 mois après injection et électrotransfert) par Magdalena Ibanez-Ruiz au laboratoire. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.1 suivant : pour chaque souris, la patte gauche a été injectée et électrotransférée et la patte droite n'a pas été traitée. Ce muscle droit nous sert de contrôle interne. Pour l'ensemble des colonies récupérées, l'ADN plasmidique a été extrait comme précédemment et validé par digestion par *EcoRI*. Dans tous les cas, le profil de digestion a confirmé la présence

des plasmides recherchés. Il est donc également possible de récupérer du plasmide sous forme épisomale dans l'ADN total extrait d'un muscle 14 mois après injection et électrotransfert.

Lot	Muscle	Traitement	Nb. colonies
1	gauche	20 μ g pXL3010 + 20 μ g pTet-tTAk	7
	droit	⊙	0
2	gauche	20 μ g pGJA14 + 20 μ g pTet-tTAk	17
	droit	⊙	0
3	gauche	20 μ g pGJA14 + 20 μ g pTet-tTAk + doxycycline	25
	droit	⊙	0
4	gauche	20 μ g pGJA15-2 + 20 μ g pTet-tTAk	28
	droit	⊙	0
5	gauche	20 μ g pGJA15-2 + 20 μ g pTet-tTAk + doxycycline	19
	droit	⊙	0

TAB. 4.1 – *Détection de plasmide sous forme épisomale 14 mois après injection et électrotransfert.* Le symbole ⊙ signifie que le muscle n'a pas été traité.

Le maintien sous forme épisomale de plasmides au sein des cellules peut donc participer à l'expression à long terme observée après injection et électrotransfert de plasmide dans le muscle tibial cranial de souris. Cependant il est impossible de savoir si cet ADN épisomal est actif pour la transcription et conduit effectivement à une expression à long terme, une ou plusieurs copies intégrées, s'il en existe, peuvent être responsable de cette expression.

4.3 Etude de la possible intégration de l'ADN plasmidique

Nous avons donc montré que du plasmide sous forme épisomale se trouvait encore plusieurs mois après injection et électrotransfert au sein des cellules du muscle traité. Cependant ceci n'exclut pas un éventuel événement d'intégration de certains plasmides dans le matériel génétique des cellules.

Dans la littérature, plusieurs études ont montré par PCR après migration sur gel de l'ADN total pour séparer au maximum l'ADN plasmidique du génomique, que lors d'une injection seule, la quantité de plasmide restant associé avec l'ADN génomique de haut poids moléculaire est entre 1 et 30 copies par μ g d'ADN [360–364], sachant que 1 μ g d'ADN correspond environ à 300 000 cellules. Cet ADN détecté peut être extrachromosomal ou intégré : en effet, les méthodes de purification utilisées, comme l'électrophorèse en champ pulsé par exemple, ne permettent pas d'avoir une efficacité de séparation de 100%, et la PCR spécifique d'un fragment de l'ADN plasmidique réalisée par la suite ne permet pas de discriminer entre un plasmide intégré ou épisomal.

L'électrotransfert permet d'augmenter fortement l'efficacité du transfert de gène, il est donc possible que cette technologie augmente la fréquence d'intégration. En effet, les facteurs pouvant affecter cette intégration sont la séquence du plasmide, la voie d'administration, l'utilisation d'adjuvants, et la nature de la protéine exprimée [363].

Un grand nombre de techniques sont utilisées avec succès pour isoler et caractériser des événements d'intégration d'ADN plasmidique dans de l'ADN génomique, mais dans la plupart des cas l'événement d'intégration est présent dans un grand nombre de cellules ou présent dans une population clonale de cellules ce qui fait que de nombreuses cellules ont la même configuration d'intégration.

La difficulté de cette étude *in vivo* sur l'ADN de cellules du muscle traité est que (1) la

fréquence d'intégration reste vraisemblablement faible, (2) le site d'intégration est aléatoire, (3) peu de cellules musculaires se divisent, et elles n'ont pas un caractère clonal donc chaque événement d'intégration est présent en copie quasi-unique, (4) seule la séquence du plasmide est connue et (5) dans l'ADN total extrait se trouve une grande majorité de plasmide sous forme épisomale qui risque d'induire des faux positifs.

Nous avons utilisé différentes stratégies pour tenter de définir un protocole fiable permettant de détecter un événement d'intégration dans l'ADN génomique [365]. Le principe de toutes ces stratégies est d'amplifier une séquence d'ADN qui soit à la fois spécifique du plasmide dont on étudie l'intégration et de l'ADN génomique au sein duquel se trouve cette éventuelle intégration. Or la difficulté réside dans le fait que seule la séquence du plasmide est connue puisque on ne connaît pas la zone du génome où il se trouve éventuellement. Pour la mise au point des stratégies, nous avons travaillé dans un premier temps sur un modèle, c'est-à-dire sur l'ADN génomique de lignées stables dans lesquelles le plasmide est intégré en copie unique dans chaque cellule. On se place donc dans un cas très favorable (pas de plasmide épisomal, une configuration d'intégration unique et présente en de nombreuses copies) pour la mise au point tout en étant bien conscient que la détection sur l'ADN extrait de muscle sera plus compliquée.

4.3.1 Stratégie n°1 : utilisation de séquences répétitives B1 et B2

Le principe de cette stratégie est l'utilisation de séquences répétitives au sein de l'ADN génomique qui fourniront un point d'ancrage pour l'amplification associée à une séquence spécifique de l'ADN plasmidique intégré. Les trois principaux groupes de séquences répétées dispersées sur l'ADN génomique sont les microsatellites, les SINE (Short INterspersed Elements, éléments de quelques centaines de nucléotides) et les LINE (Long INterspersed Elements, éléments de plusieurs milliers de nucléotides). Les éléments SINE sont des éléments mobiles de l'ADN dérivés des gènes de petits ARN, transcrits par l'ARN polymérase III : ARNt et ARN 7SL. Des familles de SINE ont été identifiées dans de nombreux organismes animaux invertébrés, vertébrés ou végétaux. Les exemples de SINE les mieux connus sont l'élément Alu chez l'homme et les éléments B1 et B2 chez la souris. Ces séquences B1 et B2 (tout comme la séquence Alu chez l'homme) présentent un grand intérêt pour la détection de sites d'intégration car elles sont situées dans des régions favorables à la recombinaison. Nous avons choisi d'utiliser ces deux éléments B1 et B2 (longs d'environ 150 bases) : sachant qu'il y a environ 564 000 copies de l'élément B1 et 348 000 copies de l'élément B2 dans le génome de souris constitué de $2,5 \cdot 10^9$ bases on peut considérer qu'en moyenne deux éléments B1 et/ou B2 sont distants de 2,7kb [366]. Un événement d'intégration aléatoire se trouve donc en moyenne à 1,3kb de deux éléments B1 et/ou B2. Il est donc théoriquement possible dans des conditions de PCR adéquates d'amplifier un fragment d'ADN avec une amorce spécifique du plasmide d'intérêt et une amorce spécifique d'un des éléments B1 ou B2. Il existe au total 16 combinaisons possibles d'intégration d'un plasmide entre deux séquences B1 et/ou B2, et tous ces cas sont envisageables (figure 4.3) avec la même probabilité.

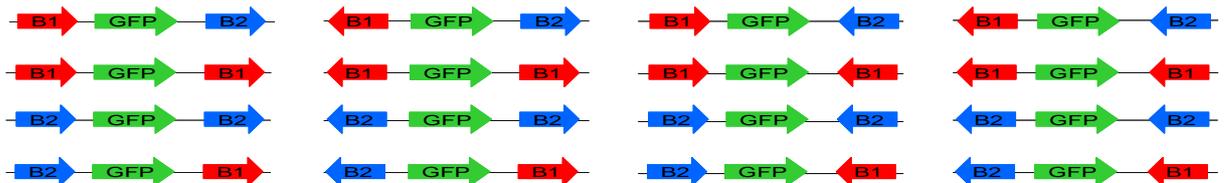


FIG. 4.3 – Différentes configurations possibles d'intégration d'un plasmide entre deux séquences B1 et/ou B2.

Pour mettre au point cette technique, nous avons travaillé sur l'ADN génomique extrait des cellules de deux lignées stables NIH/3T3-GFP distinctes. Pour réaliser ces lignées, le plasmide pEGFPC1 a été digéré par l'enzyme de restriction *DraIII* (coupure unique), puis mis en incubation avec des cellules NIH/3T3 avant électroporation. Dans chacune de ces lignées, le gène de la GFP a été intégré en une copie unique (lignées stables réalisées par Dr. Virginie Escriou au laboratoire). Le principe de cette technique est donc de réaliser une double PCR nichée, c'est-à-dire deux PCR successives en utilisant pour la deuxième PCR des amorces spécifiques du fragment amplifié par la première PCR, pour augmenter la spécificité de l'amplification : la première PCR est réalisée avec une amorce spécifique du gène de la GFP (EGFPN ou EGFPCC) et une amorce spécifique d'un élément B1 ou B2 (B1N, B1C ou B2N, B2C), la deuxième PCR est réalisée avec une amorce spécifique du gène de la GFP (EGFPCN ou EGFPC selon la première amorce choisie) et toujours une amorce spécifique d'un élément B1 ou B2 (B1N, B1C ou B2N, B2C) (figure 4.4).

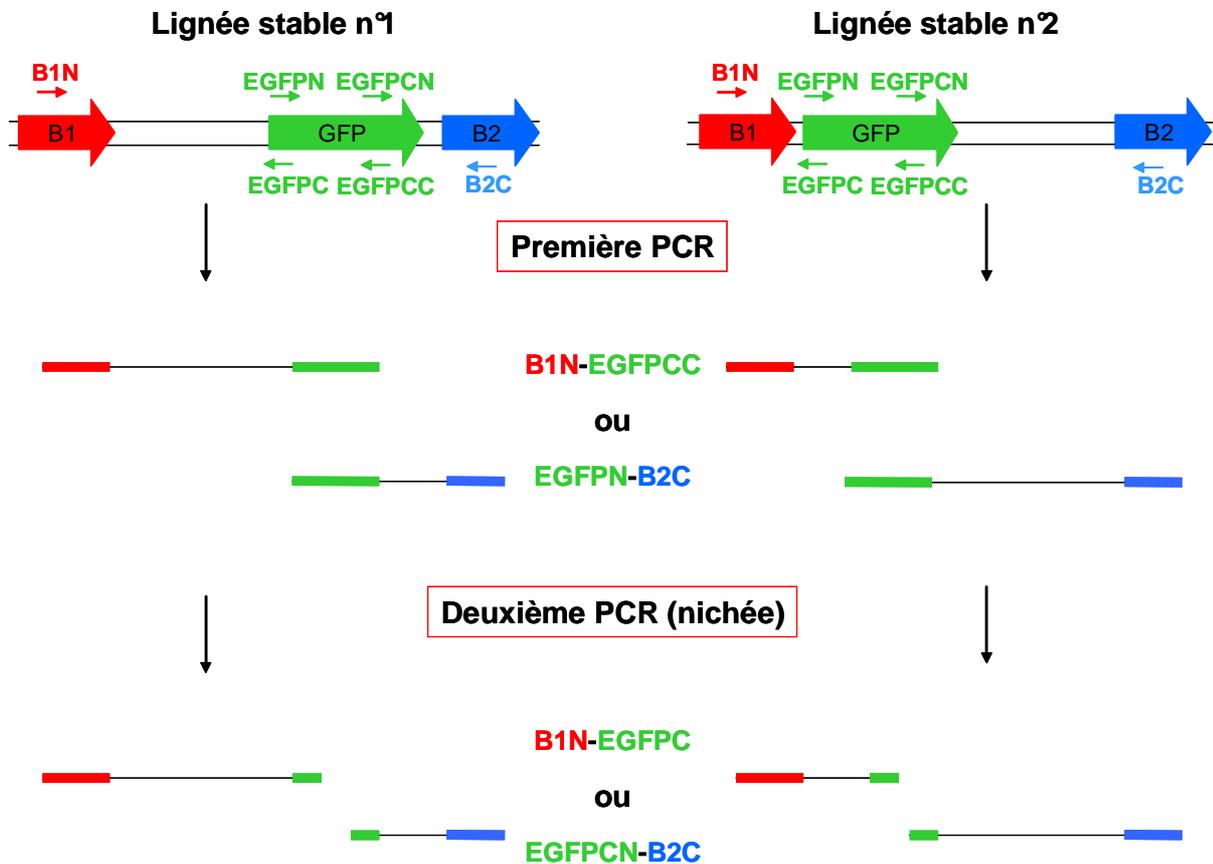


FIG. 4.4 – *Stratégie n°1 : utilisation de séquences répétitives B1 et B2* Amplifications en parallèle sur l'ADN de deux lignées stables. Amorces utilisées : B1N : 5'gtctacatagtgagttccga3', B1C : 5'tcggaactcattatgtagac3', B2N : 5'tctgaagacagctacagtga3', B2C : 5'tacactgtacctgtcttcaga3', EGFPN : 5'tggtgagcaagggcgagg3', EGFPC : 5'cctegcccttgctcacca3', EGFPN : 5'catcgaggacggcagcgt3', EGFPC : 5'acgtgcctcctcgatg3'

Nous avons travaillé sur l'ADN des deux lignées en parallèle pour pouvoir comparer les résultats et ainsi détecter toute amplification non spécifique : en effet il n'y a aucune raison que le gène de la GFP soit intégré au même endroit sur les deux échantillons, il n'y a donc aucune raison d'amplifier des fragments de même taille sur les deux échantillons, sauf s'il s'agit

d'amplification non spécifique du plasmide comme par exemple des amplifications B1-B1 ou B2-B2 selon l'amorce choisie.

Pour un premier essai nous avons pris comme hypothèse de travail que l'intégration avait eu lieu selon le profil suivant : élémentB1-GFP-élémentB2 (ce cas est celui représenté figure 4.4). C'est bien sûr une hypothèse de travail mais en théorie toutes les combinaisons devraient être testées. Nous avons donc effectué d'une part une PCR avec les amorces B1N et EGFPCC et une deuxième PCR sur le produit de la première avec les amorces B1N et EGFPN, et d'autre part une PCR avec les amorces B2C et EGFPN et une deuxième PCR sur le produit de la première avec les amorces B2C et EGFPN. Chaque PCR a été reproduite sur les deux échantillons d'ADN issus des deux lignées stables. Le programme de PCR utilisé est dans tous les cas : 95°C 5min-58°C 5min-35 cycles (95°C 30s-58°C 45s-72°C 2min)-72°C 5 min.

Cette stratégie n'a pas fonctionné : nous avons chaque fois amplifié des bandes non spécifiques que nous avons retrouvées de façon identique pour les deux échantillons alors que le gène de la GFP est intégré à des endroits distincts. Il est très probable qu'étant donné la fréquence des éléments B1 et B2 dans le génome de souris, nous avons principalement généré des fragments de PCR B1-B1 ou B2-B2. Il faut noter que nous n'avons testé qu'une configuration d'intégration parmi les 16 possibles. Cependant nous avons décidé d'abandonner cette stratégie qui manque de spécificité au profit d'une autre stratégie plus sensible.

4.3.2 Stratégie n°2 : LAM-PCR

Cette stratégie repose sur une LAM-PCR (Linker adaptor-mediated PCR), c'est-à-dire une amplification par PCR médiée par la liaison d'adaptateurs. Cette technique a été mise au point initialement par Siebert et al. en 1995 [367] puis améliorée par Spertini et al. en 1999 [368]. Le principe de cette stratégie est le suivant (figure 4.5) :

- l'ADN génomique est digéré par une enzyme de restriction ayant en moyenne une fréquence de coupure de quelques milliers de paires de base,
- les longs fragments d'ADN ainsi générés sont flanqués en 5' et en 3' d'adaptateurs par ligation. Ces adaptateurs synthétiques sont constitués de deux oligonucléotides partiellement complémentaires, s'hybridant de telle sorte à reconstituer les fragments cohésifs caractéristiques de l'enzyme de restriction,
- deux PCR nichées sont effectuées avec des amorces spécifiques du plasmide recherché et de la séquence de l'adaptateur,
- de plus la conformation de l'adaptateur permet d'éliminer des amplifications non spécifiques. En effet si une amplification adaptateur-adaptateur a lieu, le produit de PCR ainsi généré possède deux extrémités 5' et 3' complémentaires et de longue taille (40pb) : lors de l'étape d'hybridation, chaque extrémité des fragments simple brin vont s'hybrider formant ainsi une structure stable (en forme de poignée de casserole ou «panhandle») qui ne pourra plus être amplifiée. Cette stratégie porte le nom de PCR «suppressive»

L'adaptateur que nous avons utilisé est schématisé figure 4.6. Il est constitué de deux oligonucléotides UPOC (40pb) et LWOC (12pb) qui s'hybrident sur 6 bases reconstituant ainsi en 3' de UPOC le fragment cohésif caractéristique de *XbaI*. Les deux bases en 3' de LWOC ne s'hybrident pas sur UPOC pour éviter que la polymérase puisse amplifier cet adaptateur. La séquence UPOC a été construite avec de nombreux sites de restriction pour l'identification finale du fragment amplifié et pour faciliter le clonage du fragment de PCR obtenu pour son séquençage. De plus elle est de longue taille pour permettre une PCR «suppressive» en cas d'amplification non spécifique. Les amorces AP1 et AP2 sont choisies sur la séquence UPOC de façon à pouvoir réaliser deux PCR nichées. L'adaptateur est synthétisé par simple hybridation en mettant en incubation les

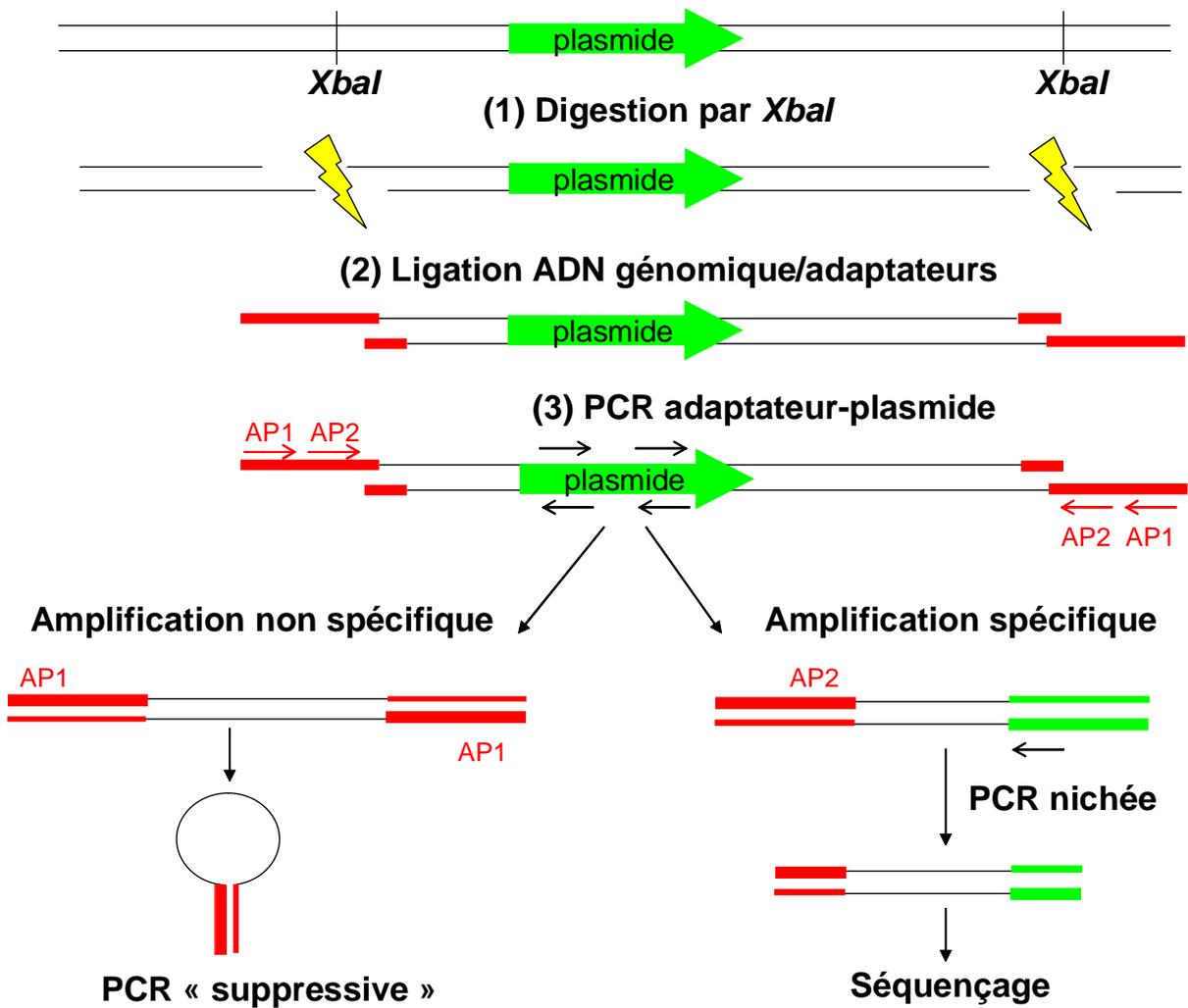


FIG. 4.5 – *Stratégie n°2 : LAM-PCR.* Voir dans le texte pour la légende.

oligonucléotides UPOC (100µM) et LWOC (100µM) pendant 2 minutes à 80°C puis 45 minutes à 25°C.

	<i>SfuI</i>	<i>NdeI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>NruI</i>	<i>XbaI</i>	UPOC LWOC
	5'-CTTCGAA <i>C</i> CATATGCGATATCAAAGCTTCCGTCGCACTCGT-3'						
	3'-AATGAGCAGATC-5'						
pcR2.1	0	0	1	1	0	1	
pXL3010	0	2	0	1	0	0	
pEGFPC1	2	0	1	1	0	1	
	5'-CTTCGAA <i>C</i> CATATGCGATATCAA-3'				AP1		
	5'-GATATCAAAGCTTCCGTCGC-3'				AP2		

FIG. 4.6 – *Schéma de l'adaptateur et des amorces AP1 et AP2.* La séquence UPOC possède de nombreux sites de restriction, et nous avons représenté pour les différents plasmides de l'étude le nombre de sites de coupure correspondants. En dessous sont représentées les deux amorces AP1 et AP2 pour la double PCR nichée spécifique de l'adaptateur.

Nous avons choisi l'enzyme *XbaI* pour la digestion de l'ADN génomique car cette enzyme génère en moyenne des fragments de 3 000 bases chez la souris (Source : NEB) et ne coupe pas le plasmide pXL3010. Ce dernier point est important pour l'étude de l'intégration sur des muscles de souris injectés et électrotransférés avec ce plasmide pXL3010, puisque l'absence de site *XbaI* sur le plasmide permet de s'affranchir de la fixation d'adaptateurs sur ce plasmide épisomal, qui entraînerait une amplification principalement de l'ADN plasmidique épisomal présent dans le muscle et générerait donc un faux positif.

Dans un premier temps nous avons travaillé sur l'ADN génomique extrait de la lignée stable NIH/3T3-GFP. Le plasmide pEGFPC1 y est intégré en copie unique et possède un site *XbaI* mais il n'y a pas de risque d'amplification non spécifique puisque dans une lignée stable il n'y a pas de plasmide sous forme épisomale.

L'ADN génomique (3 μ g) est digéré par *XbaI* pendant une nuit à 37°C. La ligation de l'adaptateur à l'ADN est réalisée à l'aide d'une ligase pendant une nuit à 16°C.

Différents programmes de PCR ont été testés et sont décrits dans le tableau 4.2.

essai	nom	PCR	Programme
1	PCR classique	1	35 cycles (94°C 30s-58°C 30s-72°C 3min)
		2	35 cycles (94°C 30s-58°C 30s-72°C 3min)
2	PCR nichée	1	7 cycles (94°C 25s-72°C 3min) + 32 cycles (94°C 25s-65°C 3min)
		2	5 cycles (94°C 25s-67°C 3min) + 22 cycles (94°C 25s-60°C 3min)
3	PCR Touch Down	1	9 cycles (94°C 30s-70°C 30s décrémente de 2°C/cycle-72°C 3min) + 13 cycles (94°C 15s-54°C 15s-72°C 3min)
		2	9 cycles (94°C 30s-70°C 30s décrémente de 2°C/cycle-72°C 3min) + 30 cycles (94°C 15s-54°C 15s-72°C 3min)

TAB. 4.2 – *Différents programmes de PCR testés pour la stratégie LAM-PCR.*

Le premier programme testé est un programme de PCR classique avec une température d'hybridation (T_m) choisie entre 58 et 60°C et 3 minutes d'élongation. A partir de ce premier programme, deux programmes ont été évalués pour augmenter la spécificité. Le deuxième programme est inspiré de Spertini et al. [368] : il consiste à ajouter quelques cycles d'hybridation à haute température (72°C) au début du programme qui vont conduire à une hybridation à faible rendement mais très spécifique. Ceci permet d'augmenter le rapport signal/bruit en augmentant le signal spécifique : les premiers cycles généreront quelques copies de plus de cet événement rare que l'on cherche à détec. Le troisième programme repose sur une PCR «Touch-Down» [369,370] : la température d'hybridation est progressivement diminuée de 70 à 54°C en diminuant la température de 2°C à chaque cycle, là encore pour avoir une amplification initiale plus spécifique.

Ces différents essais sur l'ADN génomique de la lignée stable ne nous ont pas permis de mettre au point la LAM-PCR sur notre échantillon. Il semble fort probable que l'étape limitante est la ligation : dans notre cas on recherche un fragment d'ADN rare qui a été digéré par *XbaI* et qui contient le plasmide pEGFPC1. Pour pouvoir détecter ce fragment il faut que ce fragment possède des adaptateurs aux deux extrémités 5' et 3', ce qui nécessite que chaque fragment d'ADN génomique digéré possède deux adaptateurs aux extrémités.

4.3.3 Stratégie n°3 : amorce biotinylée + LAM-PCR

Cette stratégie repose sur l'utilisation d'une stratégie LAM-PCR combinée à l'utilisation d'une amorce biotinylée spécifique du plasmide recherché. Cette technique a été décrite par Schmidt et al. pour la détection d'événements d'intégration de rétro- et lentivirus sur des leuco-

cytes [371]. Le principe de cette stratégie est le suivant (figure 4.7) :

- une amplification linéaire est réalisée avec une amorce biotinylée spécifique du plasmide recherché,
- les fragments simple brin ainsi formés sont isolés par leur extrémité biotinylée grâce à des billes magnétiques recouvertes de streptavidine,
- à partir de ces fragments et à l'aide d'hexanucléotides on reconstitue des fragments d'ADN double brin,
- les fragments ainsi reconstitués sont digérés par l'enzyme de restriction *XbaI* qui a en moyenne une fréquence de coupure de 3000 paires de bases,
- les fragments d'ADN ainsi générés sont flanqués d'un adaptateur au niveau du fragment cohésif généré par *XbaI* par ligation,
- deux PCR nichées sont effectuées avec des amorces spécifiques du plasmide recherché et de la séquence de l'adaptateur.

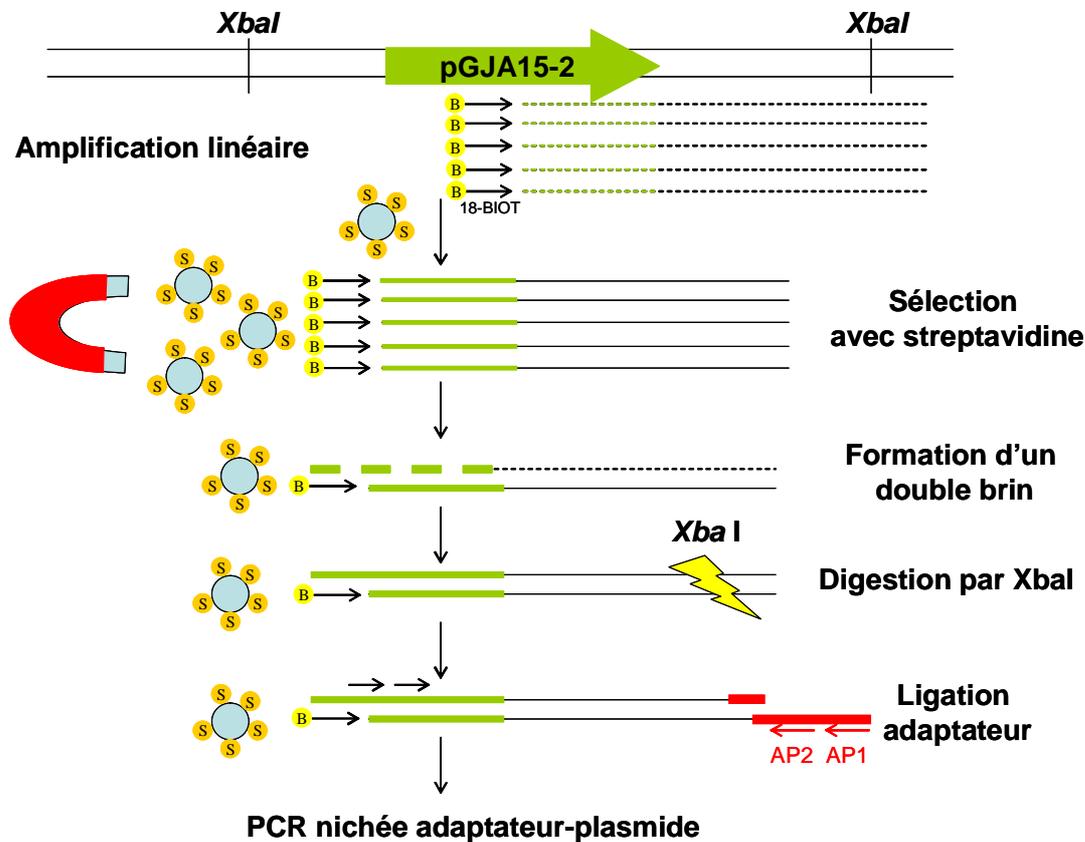


FIG. 4.7 – *Stratégie n°3 : amorce biotinylée + LAM-PCR.* Voir dans le texte pour la légende.

Pour cette stratégie nous avons directement travaillé sur l'ADN génomique extrait de muscle injecté et électrotransféré avec le plasmide pGJA15-2 (voir Chapitre 2 Résultat) car nous ne disposons à ce moment là que d'amorces biotinylées spécifiques de ce plasmide pGJA15-2 : l'une notée 18-BIOT 5'Biot-gagggcgggccagctcacca3' en position 1837-1856, l'autre notée 91-BIOT 5'Biot-cgagcgcagcagtcagtga3' en position 3261-3280 sur le plasmide pGJA15-2.

L'amplification linéaire est réalisée sur 100ng d'ADN total extrait avec 0,25pmol d'amorce biotinylée et 0,5U de polymérase. Le programme de PCR est réalisé à 58°C avec 100 cycles

(94°C 30s-58°C 30s-72°C 3min) et ajout de Taq polymérase au bout de 50 cycles. Les fragments d'ADN linéaire obtenus à l'issue de cette amplification sont isolés grâce à des billes magnétiques recouvertes de streptavidine et l'utilisation d'un barreau magnétique. La formation de l'ADN double brin est réalisée en plaçant en incubation à 37°C pendant une heure les brins d'ADN isolés avec une polymérase Klenow (2U), 300µM de dNTP et un mélange d'hexanucléotides aléatoires. Les fragments d'ADN double brin ainsi obtenus sont digérés par l'enzyme de restriction *XbaI* qui coupe en moyenne toutes les 3 000 paires de base sur l'ADN génomique donc on peut s'attendre à ce qu'il y ait un site *XbaI* sur le fragment amplifié linéairement. Il s'agit de la même hypothèse que pour la stratégie n°2. L'adaptateur (cf. figure 4.6) est fixé sur les fragments d'ADN digérés à l'aide d'une ligase pendant une nuit à 16°C. On effectue ensuite deux PCR nichées avec les mêmes programmes et les mêmes amorces que pour la stratégie n°2 (cf. tableau 4.2).

Cette stratégie ne nous a pas donné de résultats encourageants mais nous avons vraisemblablement un problème avec les billes recouvertes de streptavidine utilisées. Nous n'avons cependant pas poursuivi cette stratégie avec de nouvelles billes car au même moment une nouvelle stratégie plus sensible a été décrite par Wang et al [372].

4.3.4 Stratégie n°4 : la PCR RAIC

Les stratégies précédemment citées n'ont jamais été décrites dans la littérature pour la détection d'un événement d'intégration *in vivo* dans le cadre d'un transfert de gène non viral jusqu'à ce que, en 2004, Wang et al. mettent en évidence pour la première fois un événement d'intégration d'un ADN plasmidique dans l'ADN génomique d'un muscle de souris après injection et électrotransfert [372]. La technique qu'ils ont utilisé est une combinaison des stratégies précédentes qu'ils ont optimisées et améliorées pour augmenter l'efficacité et la sensibilité.

Suite à cette publication nous avons donc poursuivi notre étude en utilisant leur technique pour analyser si dans nos conditions d'électrotransfert (électrodes plaques, 200V/cm, 8 impulsions unipolaires de 20ms, 2Hz), sensiblement différentes de celles utilisées par Wang et al. (électrodes aiguilles, 100V/cm, 10 trains de 10³ impulsions bipolaires de 200µs), une intégration était détectable. En effet il est possible que des conditions d'électroporation différentes puissent conduire à un effet différent sur l'état de l'ADN.

La méthode utilisée par Wang et al. est nommée RAIC PCR pour Repeat-Anchored Integration Capture. C'est une combinaison des différentes stratégies précédemment citées, judicieusement choisies pour allier sensibilité et spécificité optimales :

- une séquence répétitive sur l'ADN génomique est choisie comme point d'ancrage pour une première amorce (repeat-anchored PCR). On utilisera l'élément B1 SINE.
- l'amorce spécifique de cet élément B1, nommée Double-Tag-B1, porte une séquence «Double-Tag» qui servira de point d'ancrage pour deux PCR successives (on s'affranchit ainsi de l'étape limitante de ligation de la LAM-PCR). De plus cette amorce est synthétisée avec des uraciles à la place des thymines pour pouvoir ensuite par un traitement à la Uracile ADN-Glycosylase(UDG) éliminer toute amplification B1-B1 non spécifique de la séquence cherchée. En effet, dans le cas d'une amplification non spécifique B1-B1, les amorces utilisées Double-Tag-B1 étant synthétisées avec des uraciles, les extrémités 5' de chaque fragment d'ADN seront digérées par l'enzyme UDG et ne permettront donc plus la fixation des amorces Tag et Tag-nichée lors des PCR suivantes,
- on réalise 3 PCR nichées successives,
- les amorces spécifiques du plasmide sont biotinylées pour les deux premières PCR afin d'isoler les fragments spécifiques du mélange de PCR grâce à des billes magnétiques recouvertes de streptavidine.

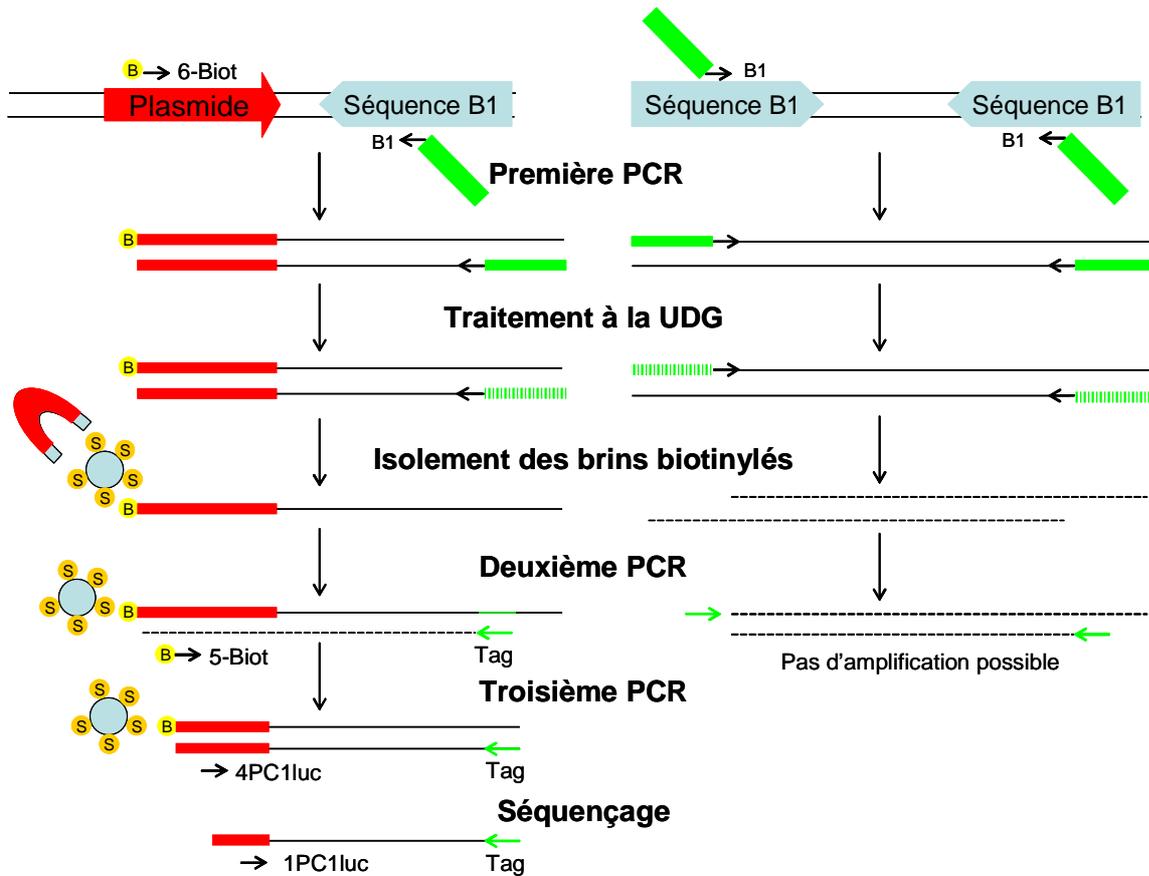


FIG. 4.8 – *Stratégie n°4 : PCR RAIC.* Voir dans le texte pour la légende.

Pour mettre au point cette technique, nous avons travaillé sur l'ADN génomique extrait des cellules d'une lignée stable B16-Luc. Pour réaliser cette lignée, le plasmide pC1-luc a été digéré par l'enzyme de restriction *DraIII* (coupure unique), puis incubé avec des cellules B16 avant électroporation. Le gène de la GFP a été intégré en une copie unique (lignées stables réalisées par Dr. Virginie Escrivo au laboratoire). Afin de valider cette technique, notre objectif est de se placer dans un cas favorable avec cette lignée stable B16-Luc, puisque nous connaissons la séquence au niveau de la jonction plasmide pC1-luc/ADN génomique (le site *DraIII* pour le plasmide) et chaque cellule possède une intégration du plasmide. Dans le cas des muscles, la situation sera différente puisque le plasmide a pu être inséré dans l'ADN génomique à n'importe quel site et cet événement peut être rare. En parallèle nous avons travaillé sur l'ADN extrait de cellules B16 qui nous sert de contrôle : la comparaison des deux échantillons nous permet de détecter d'éventuelles amplifications non spécifiques sur l'ADN génomique de cellules B16.

Nous avons donc réalisé en parallèle sur l'ADN extrait des cellules B16-luc et des cellules B16, trois PCR nichées successives (notées PCR1, PCR2 et PCR3, voir Matériel et Méthodes). Brièvement, l'ensemble de l'essai se déroule de la façon suivante : la PCR1 (10 cycles) est réalisée sur 0,5µg d'ADN génomique avec les amorces B1 et 6-BIOT. A l'issue de cette PCR le produit de PCR est purifié et traité à la Uracile ADN-Glycosylase pendant 30 minutes à 37°C. Les fragments biotinylés sont ensuite isolés grâce à des billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Les fragments d'ADN double brin sont dénaturés dans une solution de NaOH pour éliminer les brins non biotinylés. Les billes contenant les brins biotinylés sont utilisées pour la PCR2. La PCR2

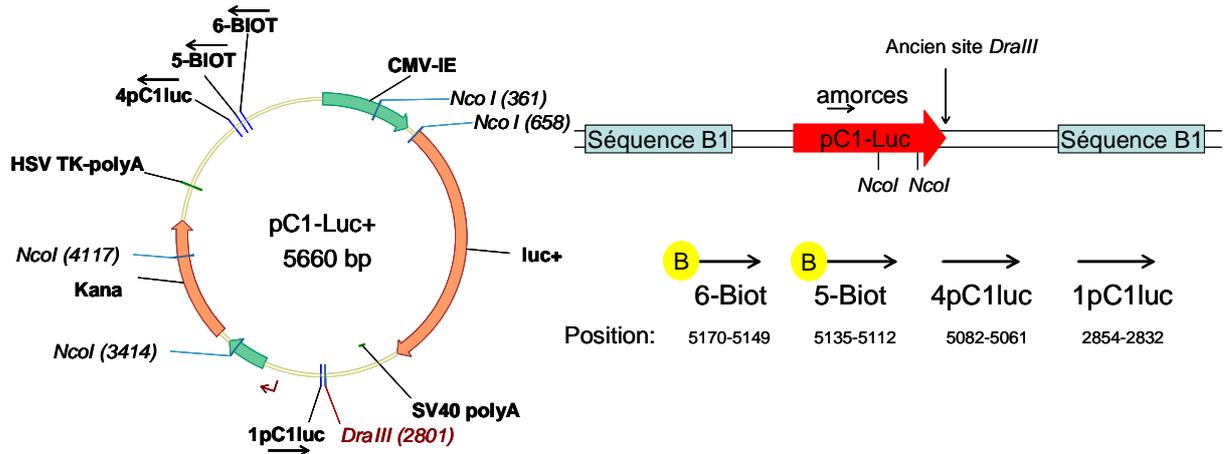


FIG. 4.9 – Schéma du plasmide pC1-luc et des amorces utilisées pour la PCR RAIC. Les amorces 6-Biot et 5-Biot sont biotinylées.

(40 cycles) est réalisée avec les amorces Tag et 5-BIOT. Les fragments biotinylés sont isolés de la même façon que précédemment. On utilise uniquement $1\mu\text{l}$ du mélange final pour la PCR3. La PCR3 (40 cycles) est réalisée avec les amorces Tag et 4PC1luc. A l'issue de cette dernière PCR on dépose le produit sur un gel d'agarose pour visualiser les fragments obtenus. Nous avons obtenu un fragment d'environ 3000 paires de base pour la condition B16-luc et uniquement un fragment de 300 paires de base pour la condition B16 (figure 4.10). Nous connaissons le site d'insertion du pC1-luc dans l'ADN génomique (figure 4.9) : une digestion du fragment de PCR de 3000pb par l'enzyme de restriction *NcoI* permet de savoir si ce produit de PCR est spécifique du plasmide pC1-luc ou pas. La digestion par *NcoI* a effectivement conduit à trois fragments de digestion, dont deux sont de tailles attendues (figure 4.10).

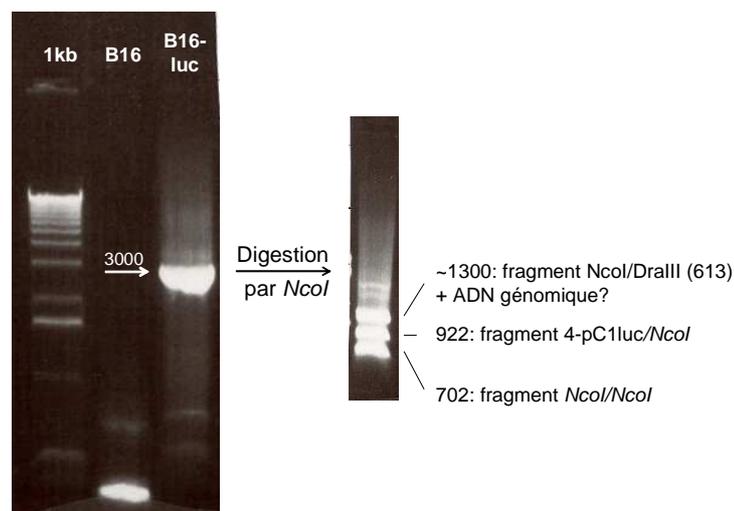


FIG. 4.10 – Détection d'une intégration sur la lignée B16-Luc à l'issue de la PCR RAIC. Le produit de PCR a été digéré par *NcoI* pour vérifier la nature du fragment.

Le produit de PCR a finalement été séquencé à l'aide d'une amorce 1PC1luc 5'gtcgaggtgccg-
taaagcactaa3' située près du site *DraIII*. Le résultat du séquençage est positif : nous avons bien

identifié une insertion du plasmide pC1-luc dans l'ADN génomique.

Ce résultat a été obtenu avec $0,5\mu\text{g}$ d'ADN génomique, ce qui correspond à 150 000 copies de plasmide pC1-luc si on considère qu'il y a une copie par cellule (en effet sachant que le génome d'une souris est d'environ $2,5 \cdot 10^9$ bases et qu'une base correspond à 300g/mol , le poids d'un génome est d'environ $3 \cdot 10^{-12}\text{g}$). Suite à ce résultat positif nous avons donc dilué l'ADN génomique des cellules B16-luc 100 000 fois dans l'ADN génomique des cellules B16 : ceci correspond à rechercher 1,5 copie de plasmide pC1-luc dans $0,5\mu\text{g}$ d'ADN génomique, une configuration plus proche de la réalité dans le cas du muscle. Par exemple, dans l'article de Wang et al. [372], le nombre de copies de plasmides est rapporté à $1\mu\text{g}$ d'ADN, soit à 300 000 copies du génome. Dans les conditions où la quantité de plasmides est maximale ($50\mu\text{g}$ de plasmide avec électrotransfert, à une semaine), une vingtaine de copies de plasmides par génome est détectée.

Nous avons reproduit ce protocole avec cette dilution au $1/100\,000$. Là encore une bande vers 3000pb a été détectée. Cette étude est toujours en cours. Ce protocole n'a pas encore été testé sur l'ADN extrait de muscles.

4.3.5 Étude de la persistance du plasmide par PCR quantitative

En parallèle de cette étude, nous avons souhaité comparer la quantité de plasmide (épissomal ou intégré) récupérée au cours du temps dans le cas d'une injection seule, combiné ou non à un électrotransfert et combiné ou non à un prétraitement à la hyaluronidase. En effet, l'électrotransfert permet d'augmenter l'expression d'un transgène en augmentant l'accessibilité de l'ADN aux cellules cibles par un double effet électrophorétique sur l'ADN et électroperméabilisant sur les cellules. D'autre part la hyaluronidase permet elle aussi une augmentation de l'expression du transgène en détruisant en partie la matrice extracellulaire rendant ainsi un accès plus facile de l'ADN aux cellules. Il est donc intéressant de s'intéresser à la quantité d'ADN accessible aux cellules dans chacun des cas injection seule/électrotransfert/hyaluronidase. Wang et al. ont montré que l'électrotransfert dans leurs conditions permettait d'augmenter entre 6 et 34 fois la quantité d'ADN présente dans les cellules musculaires [372].

Pour notre étude, nous avons réalisé une expérience *in vivo* sur des souris SWISS avec le plasmide pC1-luc. Chaque souris a été traitée avec $30\mu\text{g}$ de plasmide pC1-luc mais 9 souris ont été traitées par une injection seule, 9 souris ont été traitées par une injection suivie d'un électrotransfert et 9 souris ont été prétraitées avec de la hyaluronidase ($25\mu\text{l}$ d'une solution à $0,4\text{U}/\mu\text{l}$ 2 heures avant) suivi d'une injection et électrotransfert. Enfin 3 souris n'ont reçu aucun traitement. Les muscles de trois souris de chaque groupe ont progressivement été prélevés à 7 jours, 42 jours et 112 jours après traitement. Les résultats de cette expérience sont actuellement en cours. Toutes les mises au point ont été réalisées : le dosage de la luciférase et l'évaluation par PCR quantitative de la quantité de plasmide pC1-luc par muscle seront effectués en parallèle dans les différents cas : injection seule, injection + électrotransfert et prétraitement à la hyaluronidase. Les amorces ont d'ores et déjà été choisies sur le pC1-luc (au niveau du gène de la luciférase et de la kanamycine) et validées par PCR quantitative sur une gamme de dilutions de plasmide. La quantité de plasmide détecté est dans tous les cas rapportée à la quantité totale d'ADN génomique dans l'échantillon.

4.4 Etude de l'état de méthylation du promoteur CMV

Dans le cadre de la thérapie génique, et plus particulièrement pour le traitement de maladies chroniques il est crucial d'avoir une expression stable à long terme. Or on observe généralement une baisse de l'expression du transgène au cours du temps. Cette extinction observée peut avoir de multiples causes parmi lesquelles : (a) l'élimination des cellules transfectées, (b) l'élimination de l'ADN transfecté, (c) la baisse de l'activité du promoteur ou (d) l'élimination du produit du transgène lui-même [373].

Le but de cette étude est d'analyser s'il existe une éventuelle relation entre l'état de méthylation du transgène après injection et électrotransfert et la diminution de l'expression du transgène observée au cours du temps.

4.4.1 Introduction : la méthylation

La méthylation de l'ADN est un phénomène naturel observé chez les organismes eucaryotes et procaryotes. La méthylation de l'ADN consiste en l'addition d'un groupement méthyl sur la position du carbone 5 du noyau pyrimidique de la cytosine via une enzyme méthyltransférase : plus précisément, ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement méthyl d'un co-facteur, la S- adénosylméthionine, au carbone en position 5 de la cytosine, formant ainsi une 5-méthylcytosine (5-mC).

Chez les procaryotes, la méthylation est un moyen de protéger leur ADN de leurs propres enzymes de restriction qui sont censées éliminer l'ADN reconnu comme étranger (non méthylé).

Chez les eucaryotes, la méthylation intervient dans la régulation de l'expression des gènes [374]. Il a été démontré par exemple que la méthylation aberrante est un phénomène très répandu dans le cancer et intervient pendant l'oncogénèse. La méthylation de l'ADN a également un rôle central dans le développement embryonnaire et la régulation du cycle cellulaire.

La méthylation de l'ADN chez les eucaryotes intervient principalement sur les dinucléotides 5'-CpG-3'. En fait environ 80% des dinucléotides 5'-CpG-3' dans le génome des eucaryotes sont méthylés et la majorité des 20% restants non méthylés se situent sur les promoteurs ou dans les premiers exons des gènes.

4.4.2 Objectif de l'étude

L'activité transcriptionnelle d'un promoteur est généralement inversement proportionnelle à son état de méthylation [375]. En effet, la méthylation des sites CpG conduit généralement à l'extinction de la transcription selon plusieurs mécanismes généralement décrits [376, 377] : la méthylation de certains sites spécifiques peut empêcher la fixation de facteurs de transcription, comme NF- κ B par exemple. Cependant ce mécanisme ne peut pas expliquer à lui seul l'extinction de la transcription car il existe d'autres facteurs de transcription (comme Sp-1 par exemple) indifférents à l'état de méthylation de l'ADN. L'interaction des facteurs de transcription avec l'ADN peut être altérée, soit directement par la compétition avec des protéines fixatrices de zones méthylées, soit indirectement via des changements de la structure de la chromatine, causés par des interactions avec les histones et d'autres protéines nucléaires régulatrices. Plusieurs protéines possédant des sites de fixation à l'ADN méthylé (MBD : methylated-DNA binding domain) ont en effet récemment été décrites comme impliquées dans la répression de la transcription. Ces protéines une fois fixées sur les zones méthylées de l'ADN, s'associent avec des histones déacétylases et des complexes qui remodelent la chromatine conduisant à une stabilisation de la chromatine sous forme condensée (pour une revue voir [378]).

L'inactivation du promoteur est souvent un facteur important empêchant une expression longue et durable du transgène. Le promoteur du gène précoce du cytomégalovirus (CMV), utilisé très fréquemment, est reconnu comme étant très efficace avec une forte activité transcriptionnelle, mais est souvent sujet à une inactivation relativement rapide *in vivo*.

De nombreuses études ont montré une corrélation entre l'extinction du promoteur et son état de méthylation : dans un contexte de transfert viral (voir par exemple l'étude de Brooks et al. en 2004 sur la méthylation du promoteur CMV après transfert de gène par un adénovirus dans le muscle squelettique [379]), ou sur des cellules *in vitro* (voir par exemple l'étude de Hong et al. en 2001 *in vitro* montrant une corrélation inverse entre l'expression de la GFP et l'état de méthylation du promoteur CMV en utilisant l'azacytidine, un inhibiteur irréversible de méthyltransférase [380]).

Dans tous les cas l'efficacité de cette inactivation dépend non seulement de la position des groupements méthyl sur la région promotrice mais aussi de leur densité.

Pour notre étude nous avons utilisé les muscles de trois cinétiques du projet sur le système de régulation : l'une de 3 mois (85 jours), la deuxième de 12 mois (365 jours) et enfin la troisième de 14 mois (406 jours). Les plasmides injectés et électrotransférés dans les trois cas étaient : 20 μ g de plasmide pXL3010 pour la première et la deuxième cinétique et 20 μ g de plasmide pXL3010 ou pGJA14 ou pGJA15-2 combinés chaque fois à 20 μ g de pTet-tTAk pour la troisième cinétique (voir Résultats sur la régulation figure 2.17). A l'issue de chaque cinétique les muscles ont été prélevés et conservés à -80°C.

Le but de cette étude est d'étudier l'état de méthylation du promoteur CMV au cours du temps, cette méthylation pouvant être une cause de l'extinction progressive de l'expression.

4.4.3 Traitement au bisulfite

Pour étudier l'état de méthylation de l'ADN, la technique la plus fréquente utilise le bisulfite [381]. Cette technique consiste tout d'abord à traiter l'ADN au bisulfite, traitement qui convertit toutes les cytosines en uracile sauf les cytosines méthylées [382]. La réaction se décompose en plusieurs étapes faisant intervenir une sulfonation suivie d'une déamination et enfin d'une désulfonation alcaline (cf. figure 4.11).

Puis l'ADN traité est amplifié par PCR avec des amorces spécifiques de la séquence traitée et le produit de PCR est analysé par séquençage. L'état de méthylation de l'ADN est déterminé en comparant l'ADN traité et la séquence de l'ADN non traité (figure 4.12).

4.4.4 Choix des amorces et mise au point avec le plasmide pXL3010

La première étape de l'étude consiste à choisir des amorces spécifiques de la séquence du promoteur CMV traité au bisulfite, dans une région ne contenant pas de site CpG pour éviter tout mésappariement entre l'ADN et les amorces au cas où le site CpG serait méthylé. Nous choisissons un double jeu d'amorces pour effectuer une PCR nichée et ainsi augmenter la spécificité de la PCR. Les amorces choisies correspondent aux séquences soulignées sur l'ADN traité au bisulfite (cf. tableau 4.3). Nous nommerons OUT 1 et 2 les amorces permettant l'amplification extérieure, et les amorces IN 1 et 2 les amorces intérieures.

Des premiers tests ont été effectués sur le plasmide pXL3010 directement (c'est-à-dire non injecté) pour mettre au point un protocole efficace d'étude. Le promoteur CMV possède 37 sites CpG et deux sites de méthylation CCTGG reconnus par la méthylase bactérienne Dcm. Ces deux sites nous serviront de témoins positifs du bon fonctionnement du traitement au bisulfite, en effet le pXL3010 a été produit à partir de la souche de bactéries d'*E.coli* DH5 α de génotype F⁻,

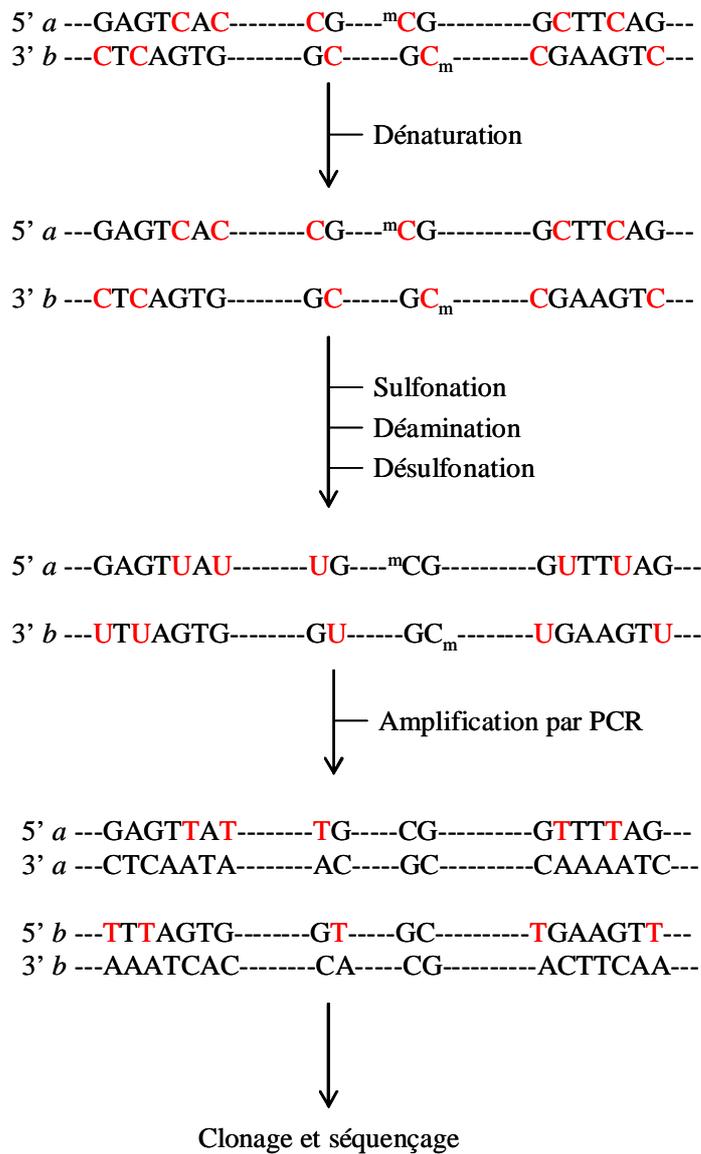


FIG. 4.12 – *Déroulement du procédé de détection des sites de méthylation de l'ADN par traitement au bisulfite. D'après [382]*

et différentes PCR ont été réalisées pour identifier les conditions optimales. Pour chaque PCR, on effectue une double PCR avec les amorces extérieures (OUT 1-2) puis intérieures (IN 1-2). Le programme des deux PCR est le suivant : 5 min à 95°C ; 35 cycles (1 min à 95°C-1 min à 50°C-1 min à 72°C) ; 5 min à 72°C. Les amorces utilisés sont pour la PCR OUT : 5'ataaattagtaaaa-taggttggt3' et 5'atatctacaaaattccaacact3' et pour la PCR IN : 5'tgtagtggttagaatatTTTTTat3' et 5'aaacttaaattcctataataa3'.

Après mises au point des conditions optimales, le profil de la PCR nichée sur le pXL3010 est représenté figure 4.13.

Les fragments obtenus à l'issue de la deuxième PCR sont extraits du gel d'agarose, et clonés dans un vecteur de clonage commercial, le vecteur pCR2.1. On effectue ensuite une transformation de bactéries compétentes DH5 α F' afin de récupérer le plasmide recombinant. Après une nuit

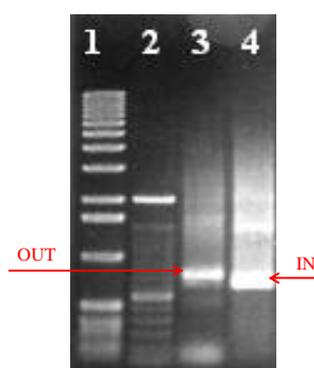


FIG. 4.13 – *Mise au point des PCR OUT et IN sur le pXL3010.* Le programme des deux PCR est le suivant : 5 min à 95°C ; 35 cycles (1 min à 95°C-1 min à 50°C- 1 min à 72°C) ; 5 min à 72°C. Les amorces utilisés sont pour la PCR OUT : 5'ataaattagtaaaataggtt3' et 5'atatctacaaaattccaacact3' et pour la PCR IN : 5'tgtagtgtagaataat3' et 5'aaacttaaactcctataataa3'. Les produits de PCR sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Disposition sur le gel : 1 : marqueur de taille 1kb ; 2 : marqueur de taille 100pb ; 3 : PCR OUT ; 4 : PCR IN.

à 37°C sur milieu adéquat (LB+Amp+X-Gal) les colonies sont récupérées et mises en culture une nouvelle nuit à 37°C pour les amplifier. Le lendemain on effectue une minipréparation afin d'extraire l'ADN plasmidique et de le séquencer. Les minipréparations positives sont caractérisées par digestion par *EcoRI* puis par électrophorèse sur gel d'agarose pour identifier un fragment de la taille de la séquence du promoteur CMV (cf. figure 4.14).

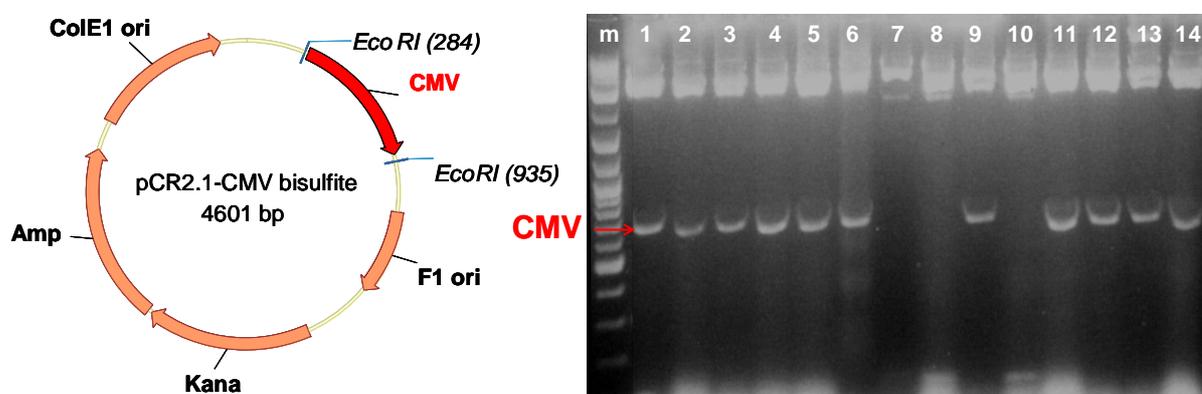


FIG. 4.14 – *Digestion des minipréparations par EcoRI pour vérifier la nature du fragment amplifié et récupéré.* Notations : m :marqueur de taille ; 1 à 14 : minipréparations après digestion par *EcoRI*.

Les minipréparations positives sont séquencées et les séquences sont analysées grâce au logiciel AlignX de Vector NTI. La présence de sites méthylés se traduit par la présence de cytosines sur la séquence traitée.

L'efficacité du traitement au bisulfite peut être vérifiée directement sur les séquences obtenues : l'absence de cytosine ailleurs que sur les deux sites de méthylation bactérienne sur la séquence du plasmide pXL3010 traité au bisulfite démontre l'efficacité totale du traitement.

à 72°C avec pour la PCR OUT : 5'ataaattagtaaaataggtt3' et 5'atatctacaaaattccaacact3' et pour la PCR IN : 5'tgtagtggttagaatattttttat3' et 5'aaacttaaattctcctataataa3'.

Lors de la double réaction de polymérisation en chaîne, on constate que la première PCR ne permet pas de visualiser un produit de PCR caractéristique vu le peu de matériel de départ et ce n'est qu'à la deuxième PCR nichée que l'on peut identifier le fragment voulu.

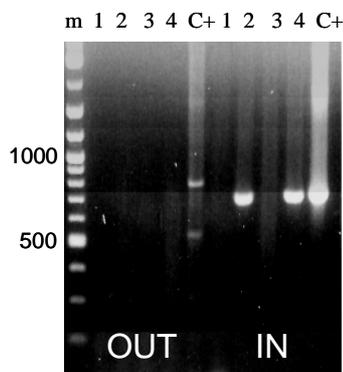


FIG. 4.17 – *PCR nichée sur l'ADN génomique total.* Voir conditions figure 4.13.

Ceci s'explique par le fait que le plasmide est cette fois dilué au milieu de la totalité de l'ADN génomique et c'est la totalité de l'ADN génomique qui subit le traitement au bisulfite. De la même façon les fragments de PCR à l'issue de la PCR in sont clonés dans le vecteur pCR2.1 pour être séquencés. Les séquences ont été analysées de la même manière que pour le plasmide seul par alignement des séquences avec la séquence du PXL3010 non traité. Les résultats des analyses effectuées sont présentés sur la figure 4.18 :

Globalement il n'y a pas de méthylation du promoteur CMV : les seuls sites méthylés sur le promoteur sont les deux sites de méthylation bactérienne (sauf pour les muscles à 14 mois qui ne sont quasiment plus méthylés au niveau des deux sites de méthylation bactérienne, nous n'avons pas d'explication à ce phénomène). On peut donc en conclure que le promoteur jusqu'à un an et demi après injection et électrotransfert ne semble subir aucune méthylation. L'extinction observée sur les cinétiques d'expression d'un gène sous contrôle de ce promoteur n'est probablement pas due à une méthylation de ce promoteur, comme cela a pu être observé dans d'autres contextes [379].

4.5 Conclusions et Perspectives

Nous avons donc montré qu'il était possible de récupérer du plasmide sous forme épisomale après plusieurs mois dans le muscle de souris injectées et électrotransférées. Ceci peut vraisemblablement expliquer les cinétiques d'expression à long terme observées après électrotransfert dans le muscle. Cependant il est indispensable de vérifier la possible intégration de ce plasmide : cette étude est encore en cours. De plus, par un traitement au bisulfite de l'ADN extrait, nous avons montré que l'extinction de l'expression observée au cours du temps ne semble pas due à une méthylation du promoteur CMV. Une étude récente *in vitro* semble confirmer ce résultat : en utilisant une séquence S/MAR, Jenke et al. ont montré que leur vecteur plasmidique se répliquait au cours des divisions et que le promoteur CMV n'était pas méthylé au cours du temps, permettant ainsi une expression à long terme [383].

Les études précédemment citées montrant une corrélation entre l'extinction du promoteur et

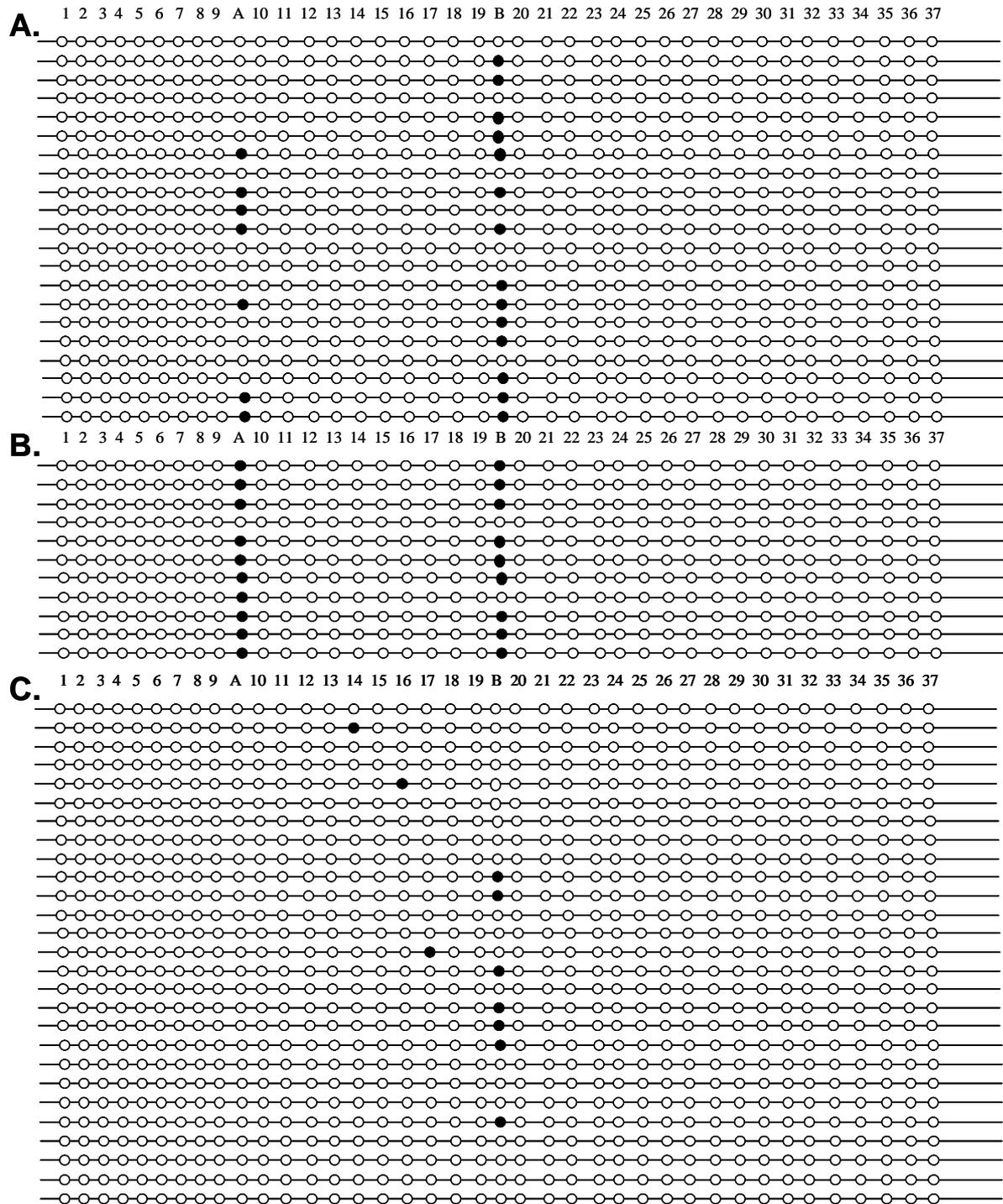


FIG. 4.18 – *Etat de méthylation du promoteur CMV du pXL3010 3 mois (A.), 12 mois (B.) et 14 mois (C.) après injection et électrotransfert dans le muscle tibial cranial de souris SCID. Le promoteur CMV possède 37 sites CpG numérotés de 1 à 37, et deux sites CCTGG notés A et B. Les sites méthylés sont signalés par des points noirs, les sites non méthylés sont signalés par des points blancs.*

son état de méthylation étaient généralement dans un contexte de transfert viral [379] ou sur des cellules *in vitro* [380]. Dans notre cas de transfert non viral *in vivo* sur le muscle aucune méthylation du promoteur n'est observée.

Certaines études suggèrent que la méthylation du transgène lui-même peut conduire à une extinction de l'expression [384], les groupement méthyles gênant la machinerie transcriptionnelle : il pourrait donc être intéressant d'étudier l'état de méthylation du gène hSeAP sur le pXL3010 injecté. Cette étude a été initiée : nous avons choisi les amorces spécifiques de la séquence hSeAP traitée au bisulfite et la mise au point de la double PCR est en cours.

D'autres causes possibles d'extinction de la transcription ont été suggérées, parmi lesquelles l'atténuation des promoteurs viraux par des cytokines [373, 385].

Enfin, Chen et al. ont récemment montré que le squelette bactérien lui-même joue un rôle sur l'extinction de l'expression [386]. Ils ont comparé l'injection de plasmides circulaires à l'injection des mêmes plasmides mais linéarisés en deux fragments pour séparer la partie bactérienne de la cassette d'expression. Dans le deuxième cas ils ont observé la formation de petits minicercles ou de larges concatémères, et vérifié que ce n'est pas la formation de ces larges structures qui donne un plus haut niveau d'expression mais bien le fait que le squelette bactérien soit loin de la cassette d'expression. La liaison covalente elle-même de la cassette d'expression avec l'ADN bactérien semble donc être une cause d'extinction de l'expression du transgène mais à l'heure actuelle le mécanisme n'est pas connu : méthylation de l'ADN, condensation de la chromatine, immunogénicité des CpG, inhibition par des cytokines ?

Conclusion

Le transfert de gène a aujourd'hui un vaste champ d'applications : maladies monogéniques, cancer, maladies infectieuses, vaccination . . . Cependant pour le développement d'essais cliniques efficaces, il est indispensable de travailler à l'amélioration de plusieurs points cruciaux : rendre les techniques de transfert de gène plus efficaces, contrôler dans le temps et dans l'espace l'expression du gène d'intérêt, maîtriser la durée d'expression du gène d'intérêt et s'assurer de la biosécurité de ce transfert de gène.

Les différents projets de ce travail de thèse s'inscrivaient dans ce cadre autour de la technique physique de transfert de gène utilisée au laboratoire, l'électrotransfert.

Un transfert de gène efficace doit répondre aux critères suivants :

- disposer du gène d'intérêt adéquat (quel est le gène déficient ou muté dans une maladie monogénique ? quel est le fragment immunogène dans le cas d'une immunisation génétique ?)
- pouvoir contrôler spatialement et temporellement le niveau de transcription du gène en fonction de la spécificité tissulaire et de l'état physiologique (comment cibler les cellules à traiter ? quel est le système de régulation de l'expression de gène idéal ?)
- disposer d'un vecteur adapté, sûr et efficace (y a-t-il un risque d'intégration dans le génome ? des risques de mutation insertionnelle ? l'expression peut-elle être maintenue à long terme ?)
- connaître la voie d'administration adaptée pour une biodisponibilité optimale (immunisation dans la peau ou le muscle ? traitement local ou systémique d'une tumeur ?)

L'objectif de ce travail de thèse a été d'explorer ces différents aspects du transfert de gène par électrotransfert :

Nous avons suivi le **transfert de gène par imagerie optique** après électrotransfert pour la mise au point de différents protocoles. Nous disposons au laboratoire d'une caméra CCD qui permet la visualisation *in vivo* de l'expression de gènes rapporteurs fluorescents ou luminescents. Nous avons ainsi suivi pendant 6 mois l'expression de la GFP au niveau des fibres musculaires d'une souris après injection et électrotransfert de 50 μ g de plasmide pEGFPC1. Nous avons vérifié chez la souris qu'un prétraitement du muscle à la hyaluronidase (2 heures avant, 25 μ l de hyaluronidase (0,4 U/ μ l)) avant injection et électrotransfert permettait une expression beaucoup plus élevée sur une zone plus étendue avec un grand nombre de fibres transfectées. Nous avons mis au point un protocole efficace de transfert de gène dans la peau dans nos conditions classiques d'électrotransfert (8 impulsions, 200V/cm, 20ms, 2Hz), en injectant un volume de solution saline d'ADN de 100 μ l en intradermique. Nous avons ainsi observé une expression du transgène pendant presque 20 jours au niveau de la peau. Enfin ces différentes études nous ont permis d'appréhender les potentialités de l'imagerie optique en tant qu'outil d'évaluation pour le suivi du transfert de gène.

Nous avons travaillé à la mise au point d'un **système de régulation de l'expression des gènes** combinant une stratégie antisens et le système de régulation Tet-Off répressible par la

tétracycline : la stratégie antisens permet d'inhiber l'expression d'un gène, le système Tet-Off permet de rendre cette inhibition régulable par la tétracycline. Nous avons tout d'abord montré par électrotransfert que la co-injection de deux plasmides sens et antisens respectivement conduit à l'extinction totale de l'expression du gène d'intérêt, par contre cette extinction n'est plus observée si l'injection du plasmide antisens est effectuée trois semaines après l'injection du plasmide sens correspondant. Nous avons ensuite montré qu'il était possible de réguler de façon efficace et pendant plus d'un an l'expression du gène de la phosphatase alcaline humaine sécrétée sur des souris immunodéficientes grâce à cette stratégie antisens conditionnelle. Cette régulation s'est avérée plus efficace si les composants du système de régulation se trouvaient sur le même plasmide, résultant probablement d'une meilleure co-localisation des plasmides constituant le système. Par contre il n'a pas été possible de réguler efficacement l'expression du gène de l'érythropoïétine sur des souris immunocompétentes. Nous avons en effet observé indirectement une réaction immune contre le transactivateur tTA, composant du système Tet-Off. L'explication pourrait venir de la grande quantité de plasmide correspondant que nous avons injecté. Une telle réaction immune a déjà été observée dans d'autres études [297–300].

Nous avons examiné le potentiel de l'électrotransfert d'ADN plasmidique pour **l'obtention d'anticorps neutralisants** contre les toxines botuliques A, B et E. Les animaux immunisés avec des plasmides codant le fragment immunogène C-terminal non toxique des toxines botuliques par électrotransfert expriment de façon endogène ces fragments de toxines, qui servent d'antigènes et déclenchent une réponse immune, selon le principe de la vaccination par ADN. Nous avons réalisé l'ensemble des études de mise au point avec le fragment C-terminal de la toxine A, qui est la mieux connue. Diverses stratégies ont été envisagées pour augmenter la réponse humorale et obtenir des titres élevés d'anticorps neutralisants dans les sérums des souris immunisées : nous avons montré que l'optimisation de la séquence de l'antigène selon l'usage des codons chez la souris permet d'augmenter la production d'anticorps, nous avons également montré que l'ajout du signal de sécrétion de l'Epo en amont de la séquence de l'antigène ne semble pas augmenter la production d'anticorps mais permet d'améliorer le pouvoir neutralisant des anticorps obtenus. Divers protocoles ont également été testés, et il apparaît que l'électrotransfert permet d'augmenter la réponse immune par rapport à une injection seule en intramusculaire. L'ajout d'un prétraitement à la hyaluronidase favorise encore cette réponse, mais n'améliore pas le pouvoir neutralisant des anticorps, ce traitement semble en effet essentiellement promouvoir une réponse cellulaire Th1. Nous avons testé une combinaison de deux injections à trois semaines ou un mois d'intervalle et ce protocole semble améliorer la réponse immune. Nous avons obtenu de la même façon des anticorps contre les toxines botuliques B et E, mais le pouvoir neutralisant de ces sérums n'a pas encore pu être évalué. L'électrotransfert permet la co-expression de plusieurs antigènes, nous avons donc évalué l'efficacité d'une co-injection des trois plasmides codant les trois fragments des toxines botuliques A, B et E et nous avons obtenu des sérums multivalents avec des titres élevés en anticorps. Vis-à-vis de la toxine A, le pouvoir neutralisant de ces sérums multivalents est moins efficace que les sérums monovalents correspondants. Enfin, nous avons réalisé un premier essai sur deux lapins, puisque à terme, il faudra travailler sur de plus gros animaux pour obtenir des quantités suffisantes de sérums neutralisants. Ce premier essai nous a permis de montrer qu'il est possible d'obtenir des anticorps neutralisants chez le lapin, mais le protocole d'immunisation n'est pas optimisé.

Le muscle squelettique est un organe de choix pour la production en systémique de protéines thérapeutiques : les fibres musculaires sont quiescentes ce qui permet un maintien du transgène et une expression à long terme. Nous avons étudié plus précisément les raisons de cette expression à

long terme en analysant **l'état de l'ADN plasmidique après injection et électrotransfert**. Plus précisément nous avons cherché à déterminer la forme de l'ADN, épisomal et/ou intégré, et son état de méthylation. Nous avons ainsi montré qu'il était possible de récupérer de l'ADN plasmidique sous forme épisomale après plusieurs mois dans le muscle de souris injectées et électrotransférées. Le maintien sous forme épisomale de plasmides au sein des cellules peut donc participer à l'expression à long terme observée après injection et électrotransfert de plasmide dans le muscle tibial cranial de souris. Cependant il est impossible de savoir si cet ADN épisomal est actif pour la transcription et conduit effectivement à une expression à long terme, une ou plusieurs copies intégrées, s'il en existe, peuvent être responsable de cette expression. Nous avons donc testé *in vitro* plusieurs techniques de détection d'événement d'intégration et finalement validé sur des cellules l'une d'entre elles nommée RAIC-PCR. Nous n'avons pas encore vérifié cette éventuelle intégration sur l'ADN génomique des muscles : cette étude est en cours. Wang et al. ont cependant démontré en 2004 la présence d'ADN intégré après électrotransfert dans le muscle dans des conditions électriques différentes des nôtres [372]. Enfin, par un traitement au bisulfite de l'ADN extrait, nous avons montré que le promoteur CMV n'était pas méthylé au cours du temps après injection et électrotransfert dans le muscle.

Il apparaît clairement qu'il n'y a pas un vecteur de transfert de gène idéal et universel. Il faut choisir pour chaque application, le vecteur de transfert de gène le plus approprié. Cependant dans un tel contexte, l'électrotransfert semble une technique physique de transfert de gène assez prometteuse pour la production en systémique de protéines et pour la vaccination.

Bibliographie

- [1] A. KAHN, "Thérapie génique : le temps d'un premier bilan", *médecine/sciences* **12**, 9 (1996).
- [2] B. T. KREN ET C. J. STEER, "The application of DNA repair vectors to gene therapy", *Curr Opin Biotechnol* **13**, 473 (2002).
- [3] A. GOYENVALLE, A. VULIN, F. FOUGEROUSSE, F. LETURCQ, J. C. KAPLAN, L. GARCIA, ET O. DANOS, "Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping", *Science* **306**, 1796 (2004).
- [4] L. A. SKORDIS, M. G. DUNCKLEY, B. YUE, I. C. EPERON, ET F. MUNTONI, "Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts", *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4114 (2003).
- [5] T. GOTO, T. NISHI, O. KOBAYASHI, T. TAMURA, S. B. DEV, H. TAKESHIMA, M. KOCHI, J. KURATSU, T. SAKATA, ET Y. USHIO, "Combination electro-gene therapy using herpes virus thymidine kinase and interleukin-12 expression plasmids is highly efficient against murine carcinomas in vivo", *Mol Ther* **10**, 929 (2004).
- [6] D. NOEL, M. PELEGRIN, S. KRAMER, C. JACQUET, N. SKANDER, ET M. PIECHACZYK, "High in vivo production of a model monoclonal antibody on adenoviral gene transfer", *Hum Gene Ther* **13**, 1483 (2002).
- [7] L. GROSSE-HOVEST, S. MULLER, R. MINOIA, E. WOLF, V. ZAKHARTCHENKO, H. WENIGERKIND, C. LASSNIG, U. BESENFELDER, M. MULLER, S. D. LYTTON, G. JUNG, ET G. BREM, "Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing", *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6858 (2004).
- [8] R. I. MAHATO, Y. TAKAKURA, ET M. HASHIDA, "Nonviral vectors for in vivo gene delivery : physicochemical and pharmacokinetic considerations", *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **14**, 133 (1997).
- [9] S. MEHIER-HUMBERT ET R. H. GUY, "Physical methods for gene transfer : improving the kinetics of gene delivery into cells", *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 733 (2005).
- [10] A. EL-ANEED, "An overview of current delivery systems in cancer gene therapy", *J Control Release* **94**, 1 (2004).
- [11] C. E. THOMAS, A. EHRHARDT, ET M. A. KAY, "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy", *Nat Rev Genet* **4**, 346 (2003).
- [12] M. A. KAY, J. C. GLORIOSO, ET L. NALDINI, "Viral vectors for gene therapy : the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics", *Nat Med* **7**, 33 (2001).
- [13] C. M. WEI, M. GIBSON, P. G. SPEAR, ET E. M. SCOLNICK, "Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1", *J Virol* **39**, 935 (1981).
- [14] N. B. WOODS, A. MUESSIG, M. SCHMIDT, J. FLYGARE, K. OLSSON, P. SALMON, D. TRONO, C. VON KALLE, ET S. KARLSSON, "Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell : risk of insertional mutagenesis", *Blood* **101**, 1284 (2003).
- [15] S. BRENNER ET H. L. MALECH, "Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy", *Biochim Biophys Acta* **1640**, 1 (2003).
- [16] T. KAFRI, U. BLOMER, D. A. PETERSON, F. H. GAGE, ET I. M. VERMA, "Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors", *Nat Genet* **17**, 314 (1997).
- [17] R. ZUFFEREY, D. NAGY, R. J. MANDEL, L. NALDINI, ET D. TRONO, "Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo", *Nat Biotechnol* **15**, 871 (1997).
- [18] T. RAGOT, N. VINCENT, P. CHAFEY, E. VIGNE, H. GILGENKRANTZ, D. COUTON, J. CARTAUD, P. BRIAND, J. C. KAPLAN, M. PERRICAUDET, ET ET AL., "Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice", *Nature* **361**, 647 (1993).

- [19] N. K. GREEN ET L. W. SEYMOUR, "Adenoviral vectors : systemic delivery and tumor targeting", *Cancer Gene Ther* **9**, 1036 (2002).
- [20] J. A. ST GEORGE, "Gene therapy progress and prospects : adenoviral vectors", *Gene Ther* **10**, 1135 (2003).
- [21] B. A. DONAHUE, J. G. MCARTHUR, S. K. SPRATT, D. BOHL, C. LAGARDE, L. SANCHEZ, B. A. KASPAR, B. A. SLOAN, Y. L. LEE, O. DANOS, ET R. O. SNYDER, "Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery", *J Gene Med* **1**, 31 (1999).
- [22] R. M. LINDEN ET S. L. WOO, "AAVant-garde gene therapy", *Nat Med* **5**, 21 (1999).
- [23] M. J. DURING, R. XU, D. YOUNG, M. G. KAPLITT, R. S. SHERWIN, ET P. LEONE, "Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector", *Nat Med* **4**, 1131 (1998).
- [24] X. O. BREAKEFIELD ET N. A. DELUCA, "Herpes simplex virus for gene delivery to neurons", *New Biol* **3**, 203 (1991).
- [25] D. S. LATCHMAN, "Herpes simplex virus vectors for gene therapy", *Mol Biotechnol* **2**, 179 (1994).
- [26] S. MIYATAKE, R. L. MARTUZA, ET S. D. RABKIN, "Defective herpes simplex virus vectors expressing thymidine kinase for the treatment of malignant glioma", *Cancer Gene Ther* **4**, 222 (1997).
- [27] S. LI ET L. HUANG, "Nonviral gene therapy : promises and challenges", *Gene Ther* **7**, 31 (2000).
- [28] U. R. HENGGE, E. F. CHAN, R. A. FOSTER, P. S. WALKER, ET J. C. VOGEL, "Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA", *Nat Genet* **10**, 161 (1995).
- [29] J. A. WOLFF, R. W. MALONE, P. WILLIAMS, W. CHONG, G. ACSADI, A. JANI, ET P. L. FELGNER, "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo", *Science* **247**, 1465 (1990).
- [30] J. A. WOLFF, J. J. LUDTKE, G. ACSADI, P. WILLIAMS, ET A. JANI, "Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle", *Hum Mol Genet* **1**, 363 (1992).
- [31] M. Y. LEVY, L. G. BARRON, K. B. MEYER, ET J. SZOKA, F. C., "Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle : evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood", *Gene Ther* **3**, 201 (1996).
- [32] K. SELMAJ, C. KOWAL, A. WALCZAK, J. NOWICKA, ET C. S. RAINE, "Naked DNA vaccination differentially modulates autoimmune responses in experimental autoimmune encephalomyelitis", *J Neuroimmunol* **111**, 34 (2000).
- [33] A. M. KRIEG, "Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy", *J Gene Med* **1**, 56 (1999).
- [34] R. I. MAHATO, "Non-viral peptide-based approaches to gene delivery", *J Drug Target* **7**, 249 (1999).
- [35] B. E. HOUK, R. MARTIN, G. HOCHHAUS, ET J. A. HUGHES, "Pharmacokinetics of plasmid DNA in the rat", *Pharm Res* **18**, 67 (2001).
- [36] H. L. DAVIS, R. G. WHALEN, ET B. A. DEMENEIX, "Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo : factors affecting efficiency of transfer and stability of expression", *Hum Gene Ther* **4**, 151 (1993).
- [37] D. SCHERMAN, M. BESSODES, B. CAMERON, J. HERSCOVICI, H. HOFLAND, B. PITARD, F. SOUBRIER, P. WILS, ET J. CROUZET, "Application of lipids and plasmid design for gene delivery to mammalian cells", *Curr Opin Biotechnol* **9**, 480 (1998).
- [38] X. ZHOU ET L. HUANG, "DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine : characterization and mechanism of action", *Biochim Biophys Acta* **1189**, 195 (1994).
- [39] J. ZABNER, A. J. FASBENDER, T. MONINGER, K. A. POELLINGER, ET M. J. WELSH, "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid", *J Biol Chem* **270**, 18997 (1995).
- [40] F. LABAT-MOLEUR, A. M. STEFFAN, C. BRISSON, H. PERRON, O. FEUGEAS, P. FURSTENBERGER, F. OBERLING, E. BRAMBILLA, ET J. P. BEHR, "An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines", *Gene Ther* **3**, 1010 (1996).
- [41] P. L. FELGNER, T. R. GADEK, M. HOLM, R. ROMAN, H. W. CHAN, M. WENZ, J. P. NORTHROP, G. M. RINGOLD, ET M. DANIELSEN, "Lipofection : a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure", *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7413 (1987).
- [42] D. LUO ET W. M. SALTZMAN, "Synthetic DNA delivery systems", *Nat Biotechnol* **18**, 33 (2000).
- [43] P. L. FELGNER ET G. M. RINGOLD, "Cationic liposome-mediated transfection", *Nature* **337**, 387 (1989).
- [44] M. COLIN, M. MAURICE, G. TRUGNAN, M. KORNPORST, R. P. HARBOTTLE, A. KNIGHT, R. G. COOPER, A. D. MILLER, J. CAPEAU, C. COUTELLE, ET M. C. BRAHIMI-HORN, "Cell delivery, intracellular trafficking and expression of an integrin-mediated gene transfer vector in tracheal epithelial cells", *Gene Ther* **7**, 139 (2000).

-
- [45] O. BOUSSIF, F. LEZOUALC'H, M. A. ZANTA, M. D. MERGNY, D. SCHERMAN, B. DEMENEIX, ET J. P. BEHR, "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo : polyethylenimine", *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7297 (1995).
- [46] B. ABDALLAH, A. HASSAN, C. BENOIST, D. GOULA, J. P. BEHR, ET B. A. DEMENEIX, "A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain : polyethylenimine", *Hum Gene Ther* **7**, 1947 (1996).
- [47] M. R. CAPECCHI, "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells", *Cell* **22**, 479 (1980).
- [48] J. W. GORDON, G. A. SCANGOS, D. J. PLOTKIN, J. A. BARBOSA, ET F. H. RUDDLE, "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA", *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7380 (1980).
- [49] J. W. GORDON ET F. H. RUDDLE, "Gene transfer into mouse embryos : production of transgenic mice by pronuclear injection", *Methods Enzymol* **101**, 411 (1983).
- [50] E. F. FYNAN, R. G. WEBSTER, D. H. FULLER, J. R. HAYNES, J. C. SANTORO, ET H. L. ROBINSON, "DNA vaccines : protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations", *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11478 (1993).
- [51] R. M. KLEIN, E. D. WOLF, R. WU, ET J. C. SANFORD, "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987", *Biotechnology* **24**, 384 (1992).
- [52] N. S. YANG, J. BURKHOLDER, B. ROBERTS, B. MARTINELL, ET D. MCCABE, "In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment", *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9568 (1990).
- [53] R. S. WILLIAMS, S. A. JOHNSTON, M. RIEDY, M. J. DEVIT, S. G. MCELLIGOTT, ET J. C. SANFORD, "Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles", *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2726 (1991).
- [54] A. T. LARREGINA, S. C. WATKINS, G. ERDOS, L. A. SPENCER, W. J. STORKUS, D. BEER STOLZ, ET J. FALO, L. D., "Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells", *Gene Ther* **8**, 608 (2001).
- [55] W. TAO, J. WILKINSON, E. J. STANBRIDGE, ET M. W. BERNS, "Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane", *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 4180 (1987).
- [56] E. ZEIRA, A. MANEVITCH, A. KHATCHATOURIANTS, O. PAPPO, E. HYAM, M. DARASH-YAHANA, E. TAVOR, A. HONIGMAN, A. LEWIS, ET E. GALUN, "Femtosecond infrared laser-an efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression", *Mol Ther* **8**, 342 (2003).
- [57] H. HERWEIJER ET J. A. WOLFF, "Progress and prospects : naked DNA gene transfer and therapy", *Gene Ther* **10**, 453 (2003).
- [58] D. J. WELLS, "Gene therapy progress and prospects : electroporation and other physical methods", *Gene Ther* **11**, 1363 (2004).
- [59] C. X. DENG, F. SIELING, H. PAN, ET J. CUI, "Ultrasound-induced cell membrane porosity", *Ultrasound Med Biol* **30**, 519 (2004).
- [60] H. J. KIM, J. F. GREENLEAF, R. R. KINNICK, J. T. BRONK, ET M. E. BOLANDER, "Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells", *Hum Gene Ther* **7**, 1339 (1996).
- [61] Q. L. LU, H. D. LIANG, T. PARTRIDGE, ET M. J. BLOMLEY, "Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage", *Gene Ther* **10**, 396 (2003).
- [62] D. L. MILLER ET J. SONG, "Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound in vivo", *Ultrasound Med Biol* **29**, 887 (2003).
- [63] P. E. HUBER, M. J. MANN, L. G. MELO, A. EHSAN, D. KONG, L. ZHANG, M. REZVANI, P. PESCHKE, F. JOLESZ, V. J. DZAU, ET K. HYNYNEN, "Focused ultrasound (HIFU) induces localized enhancement of reporter gene expression in rabbit carotid artery", *Gene Ther* **10**, 1600 (2003).
- [64] E. NEUMANN, M. SCHAEFER-RIDDER, Y. WANG, ET P. H. HOFSCHEIDER, "Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields", *Embo J* **1**, 841 (1982).
- [65] P. BONNAFOUS, M. VERNHES, J. TEISSIE, ET B. GABRIEL, "The generation of reactive-oxygen species associated with long-lasting pulse-induced electroporation of mammalian cells is based on a non-destructive alteration of the plasma membrane", *Biochim Biophys Acta* **1461**, 123 (1999).
- [66] E. NEUMANN ET K. ROSENHECK, "Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes", *J Membr Biol* **10**, 279 (1972).

- [67] J. TEISSIE ET M. P. ROLS, "An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization", *Biophys J* **65**, 409 (1993).
- [68] B. GABRIEL ET J. TEISSIE, "Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane", *Biophys J* **73**, 2630 (1997).
- [69] P. G. DE GENNES, "Passive entry of a DNA molecule into a small pore", *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7262 (1999).
- [70] V. A. KLENCHIN, S. I. SUKHAREV, S. M. SEROV, L. V. CHERNOMORDIK, ET A. CHIZMADZHEV YU, "Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis", *Biophys J* **60**, 804 (1991).
- [71] S. I. SUKHAREV, V. A. KLENCHIN, S. M. SEROV, L. V. CHERNOMORDIK, ET A. CHIZMADZHEV YU, "Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores", *Biophys J* **63**, 1320 (1992).
- [72] M. GOLZIO, J. TEISSIE, ET M. P. ROLS, "Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery", *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1292 (2002).
- [73] M. GOLZIO, M. P. ROLS, ET J. TEISSIE, "In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression", *Methods* **33**, 126 (2004).
- [74] C. FAURIE, E. PHEZ, M. GOLZIO, C. VOSSEN, J. C. LESBORDES, C. DELTEIL, J. TEISSIE, ET M. P. ROLS, "Effect of electric field vectoriality on electrically mediated gene delivery in mammalian cells", *Biochim Biophys Acta* **1665**, 92 (2004).
- [75] J. BELEHRADEK, J., S. ORLOWSKI, L. H. RAMIREZ, G. PRON, B. PODDEVIN, ET L. M. MIR, "Electropermeabilization of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin", *Biochim Biophys Acta* **1190**, 155 (1994).
- [76] L. MIR, M. BUREAU, J. GEHL, R. RANGARA, D. ROUY, J. CAILLAUD, P. DELAERE, D. BRANELLEC, B. SCHWARTZ, ET D. SCHERMAN, "High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 4262 (1999).
- [77] G. SERSA, B. STABUC, M. CEMAZAR, D. MIKLAVCIC, ET Z. RUDOLF, "Electrochemotherapy with cisplatin : the systemic antitumour effectiveness of cisplatin can be potentiated locally by the application of electric pulses in the treatment of malignant melanoma skin metastases", *Melanoma Res* **10**, 381 (2000).
- [78] M. P. ROLS, Y. TAMZALI, ET J. TEISSIE, "Electrochemotherapy of horses. A preliminary clinical report", *Bioelectrochemistry* **55**, 101 (2002).
- [79] M. F. BUREAU, J. GEHL, V. DELEUZE, L. M. MIR, ET D. SCHERMAN, "Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer", *Biochim Biophys Acta* **1474**, 353 (2000).
- [80] S. SATKAUSKAS, M. F. BUREAU, M. PUC, A. MAHFOUDI, D. SCHERMAN, D. MIKLAVCIC, ET L. M. MIR, "Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer : respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis", *Mol Ther* **5**, 133 (2002).
- [81] M. PATURNEAU-JOUAS, E. PARZY, G. VIDAL, P. BOZIN, J.-T. VILQUIN, C. WARY, P. CARLIER, K. SCHWARTZ, ET A. LEROY-WILLIG, "Electroporation-mediated delivery of a magnetic resonance imaging contrast agent into muscle to visualize electrotransfer", *Acta Myologica* **20**, 174 (2001).
- [82] M. P. ROLS, C. DELTEIL, M. GOLZIO, ET J. TEISSIE, "Control by ATP and ADP of voltage-induced mammalian-cell-membrane permeabilization, gene transfer and resulting expression", *Eur J Biochem* **254**, 382 (1998).
- [83] S. SATKAUSKAS, M. F. BUREAU, A. MAHFOUDI, ET L. M. MIR, "Slow accumulation of plasmid in muscle cells : supporting evidence for a mechanism of DNA uptake by receptor-mediated endocytosis", *Mol Ther* **4**, 317 (2001).
- [84] M. CAPPELLETTI, I. ZAMPAGLIONE, G. RIZZUTO, G. CILIBERTO, N. LA MONICA, ET E. FATTORI, "Gene electro-transfer improves transduction by modifying the fate of intramuscular DNA", *J Gene Med* **5**, 324 (2003).
- [85] M. F. BUREAU, S. NAIMI, R. TORERO IBAD, J. SEGUIN, C. GEORGER, E. ARNOULD, L. MATON, F. BLANCHE, P. DELAERE, ET D. SCHERMAN, "Intramuscular plasmid DNA electrotransfer : biodistribution and degradation", *Biochim Biophys Acta* **1676**, 138 (2004).
- [86] J. GEHL, T. H. SORENSEN, K. NIELSEN, P. RASKMARK, S. L. NIELSEN, T. SKOVSGAARD, ET L. M. MIR, "In vivo electroporation of skeletal muscle : threshold, efficacy and relation to electric field distribution", *Biochim Biophys Acta* **1428**, 233 (1999).

- [87] D. MIKLAVCIC, D. SEMROV, H. MEKID, ET L. M. MIR, "A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy", *Biochim Biophys Acta* **1523**, 73 (2000).
- [88] L. M. MIR, M. F. BUREAU, R. RANGARA, B. SCHWARTZ, ET D. SCHERMAN, "Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle", *C R Acad Sci III* **321**, 893 (1998).
- [89] R. HELLER, M. JAROSZESKI, A. ATKIN, D. MORADPOUR, R. GILBERT, J. WANDS, ET C. NICOLAU, "In vivo gene electroinjection and expression in rat liver", *FEBS Lett* **389**, 225 (1996).
- [90] T. NISHI, K. YOSHIZATO, S. YAMASHIRO, H. TAKESHIMA, K. SATO, K. HAMADA, I. KITAMURA, T. YOSHIMURA, H. SAYA, J. KURATSU, ET Y. USHIO, "High-efficiency in vivo gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following in vivo electroporation", *Cancer Res* **56**, 1050 (1996).
- [91] J. M. VICAT, S. BOISSEAU, P. JOURDES, M. LAINE, D. WION, R. BOUALI-BENAZZOUZ, A. L. BENABID, ET F. BERGER, "Muscle transfection by electroporation with high-voltage and short-pulse currents provides high-level and long-lasting gene expression", *Hum Gene Ther* **11**, 909 (2000).
- [92] M. BETTAN, M. A. IVANOV, L. M. MIR, F. BOISSIERE, P. DELAERE, ET D. SCHERMAN, "Efficient DNA electrotransfer into tumors", *Bioelectrochemistry* **52**, 83 (2000).
- [93] M. MILLER, G. REKAS, K. DAYBALL, Y. H. WAN, ET J. BRAMSON, "The efficacy of electroporated plasmid vaccines correlates with long-term antigen production in vivo", *Vaccine* **22**, 2517 (2004).
- [94] A. BERTRAND, V. NGO-MULLER, D. HENTZEN, J. P. CONCORDET, D. DAEGELEN, ET D. TUIL, "Muscle electrotransfer as a tool for studying muscle fiber-specific and nerve-dependent activity of promoters", *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C1071 (2003).
- [95] H. MARUYAMA *et al.*, "Long-term production of erythropoietin after electroporation-mediated transfer of plasmid DNA into the muscles of normal and uremic rats", *Gene Ther* **8**, 461 (2001).
- [96] G. WIDERA, M. AUSTIN, D. RABUSSAY, C. GOLDBECK, S. W. BARNETT, M. CHEN, L. LEUNG, G. R. OTTEN, K. THUDIUM, M. J. SELBY, ET J. B. ULMER, "Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo", *J Immunol* **164**, 4635 (2000).
- [97] R. DRAGHIA-AKLI, K. M. ELLIS, L. A. HILL, P. B. MALONE, ET M. L. FIOROTTO, "High-efficiency growth hormone-releasing hormone plasmid vector administration into skeletal muscle mediated by electroporation in pigs", *Faseb J* **17**, 526 (2003).
- [98] S. BABIUK, M. E. BACA-ESTRADA, M. FOLDVARI, M. STORMS, D. RABUSSAY, G. WIDERA, ET L. A. BABIUK, "Electroporation improves the efficacy of DNA vaccines in large animals", *Vaccine* **20**, 3399 (2002).
- [99] J. P. SCHEERLINCK, J. KARLIS, T. E. TJELLE, P. J. PRESIDENTE, I. MATHIESEN, ET S. E. NEWTON, "In vivo electroporation improves immune responses to DNA vaccination in sheep", *Vaccine* **22**, 1820 (2004).
- [100] S. TOLLEFSEN, M. VORDERMEIER, I. OLSEN, A. K. STORSET, L. J. REITAN, D. CLIFFORD, D. B. LOWRIE, H. G. WIKER, K. HUYGEN, G. HEWINSON, I. MATHIESEN, ET T. E. TJELLE, "DNA injection in combination with electroporation : a novel method for vaccination of farmed ruminants", *Scand J Immunol* **57**, 229 (2003).
- [101] G. OTTEN *et al.*, "Enhancement of DNA vaccine potency in rhesus macaques by electroporation", *Vaccine* **22**, 2489 (2004).
- [102] J. HARTIKKA, L. SUKHU, C. BUCHNER, D. HAZARD, V. BOZOUKOVA, M. MARGALITH, W. K. NISHIOKA, C. J. WHEELER, M. MANTHORP, ET M. SAWDEY, "Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle : plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188", *Mol Ther* **4**, 407 (2001).
- [103] A. C. DURIEUX, R. BONNEFOY, T. BUSSO, ET D. FREYSSINET, "In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle : effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage", *J Gene Med* **6**, 809 (2004).
- [104] A. RUBENSTRUNK, A. MAHFOUDI, ET D. SCHERMAN, "Delivery of electric pulses for DNA electrotransfer to mouse muscle does not induce the expression of stress related genes", *Cell Biol Toxicol* **20**, 25 (2004).
- [105] C. MENNUNI, F. CALVARUSO, I. ZAMPAGLIONE, G. RIZZUTO, D. RINAUDO, E. DAMMASSA, G. CILIBERTO, E. FATTORI, ET N. LA MONICA, "Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle", *Hum Gene Ther* **13**, 355 (2002).
- [106] D. FAVRE, Y. CHEREL, N. PROVOST, V. BLOUIN, N. FERRY, P. MOULLIER, ET A. SALVETTI, "Hyaluronidase enhances recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer in the rat skeletal muscle", *Gene Ther* **7**, 1417 (2000).

- [107] M. J. MOLNAR, R. GILBERT, Y. LU, A. B. LIU, A. GUO, N. LAROCHELLE, K. ORLOPP, H. LOCHMULLER, B. J. PETROF, J. NALBANTOGLU, ET G. KARPATI, "Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles", *Mol Ther* **10**, 447 (2004).
- [108] J. M. McMAHON, E. SIGNORI, K. E. WELLS, V. M. FAZIO, ET D. J. WELLS, "Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase – increased expression with reduced muscle damage", *Gene Ther* **8**, 1264 (2001).
- [109] F. NICOL, M. WONG, F. C. MACLAUGHLIN, J. PERRARD, E. WILSON, J. L. NORDSTROM, ET L. C. SMITH, "Poly-L-glutamate, an anionic polymer, enhances transgene expression for plasmids delivered by intramuscular injection with in vivo electroporation", *Gene Ther* **9**, 1351 (2002).
- [110] H. MARUYAMA, K. ATAKA, N. HIGUCHI, F. SAKAMOTO, F. GEJYO, ET J. MIYAZAKI, "Skin-targeted gene transfer using in vivo electroporation", *Gene Ther* **8**, 1808 (2001).
- [111] L. ZHANG, E. NOLAN, S. KREITSCHITZ, ET D. P. RABUSSAY, "Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation", *Biochim Biophys Acta* **1572**, 1 (2002).
- [112] N. PAVSELJ ET V. PREAT, "DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse", *J Control Release* (2005).
- [113] J. M. WELLS, L. H. LI, A. SEN, G. P. JAHREIS, ET S. W. HUI, "Electroporation-enhanced gene delivery in mammary tumors", *Gene Ther* **7**, 541 (2000).
- [114] L. HELLER, M. J. JAROSZESKI, D. COPPOLA, C. POTTINGER, R. GILBERT, ET R. HELLER, "Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo", *Gene Ther* **7**, 826 (2000).
- [115] M. A. IVANOV, B. LAMRIHI, M. SZYF, D. SCHERMAN, ET P. BIGEY, "Enhanced antitumor activity of a combination of MBD2-antisense electrotransfer gene therapy and bleomycin electrochemotherapy", *J Gene Med* **5**, 893 (2003).
- [116] M. CEMAZAR, I. WILSON, G. U. DACHS, G. M. TOZER, ET G. SERSA, "Direct visualization of electroporation-assisted in vivo gene delivery to tumors using intravital microscopy - spatial and time dependent distribution", *BMC Cancer* **4**, 81 (2004).
- [117] T. SUZUKI, B. C. SHIN, K. FUJIKURA, T. MATSUZAKI, ET K. TAKATA, "Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation", *FEBS Lett* **425**, 436 (1998).
- [118] F. LIU ET L. HUANG, "Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA", *Gene Ther* **9**, 1116 (2002).
- [119] D. A. DEAN, D. MACHADO-ARANDA, K. BLAIR-PARKS, A. V. YELDANDI, ET J. L. YOUNG, "Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung", *Gene Ther* **10**, 1608 (2003).
- [120] S. OHASHI, T. KUBO, T. KISHIDA, T. IKEDA, K. TAKAHASHI, Y. ARAI, R. TERAUCHI, H. ASADA, J. IMANISHI, ET O. MAZDA, "Successful genetic transduction in vivo into synovium by means of electroporation", *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 1530 (2002).
- [121] L. GROSSIN, N. GABORIT, L. MIR, P. NETTER, ET P. GILLET, "Gene therapy in cartilage using electroporation", *Joint Bone Spine* **70**, 480 (2003).
- [122] N. ITASAKI, S. BEL-VIALAR, ET R. KRUMLAUF, "'Shocking' developments in chick embryology : electroporation and in ovo gene expression", *Nat Cell Biol* **1**, E203 (1999).
- [123] J. LUO ET C. REDIES, "Overexpression of genes in Purkinje cells in the embryonic chicken cerebellum by in vivo electroporation", *J Neurosci Methods* **139**, 241 (2004).
- [124] M. TSUJIE, Y. ISAKA, H. NAKAMURA, E. IMAI, ET M. HORI, "Electroporation-mediated gene transfer that targets glomeruli", *J Am Soc Nephrol* **12**, 949 (2001).
- [125] T. INOUE ET R. KRUMLAUF, "An impulse to the brain—using in vivo electroporation", *Nat Neurosci* **4 Suppl**, 1156 (2001).
- [126] T. SAITO ET N. NAKATSUJI, "Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation", *Dev Biol* **240**, 237 (2001).
- [127] K. HAAS, K. JENSEN, W. C. SIN, L. FOA, ET H. T. CLINE, "Targeted electroporation in *Xenopus* tadpoles in vivo—from single cells to the entire brain", *Differentiation* **70**, 148 (2002).
- [128] T. KUNIEDA ET T. KUBO, "In vivo gene transfer into the adult honeybee brain by using electroporation", *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 25 (2004).
- [129] T. MATSUMOTO, K. KOMORI, T. SHOJI, S. KUMA, M. KUME, T. YAMAOKA, E. MORI, T. FURUYAMA, Y. YONEMITSU, ET K. SUGIMACHI, "Successful and optimized in vivo gene transfer to rabbit carotid artery mediated by electronic pulse", *Gene Ther* **8**, 1174 (2001).

- [130] T. MURAMATSU, O. SHIBATA, S. RYOKI, Y. OHMORI, ET J. OKUMURA, "Foreign gene expression in the mouse testis by localized in vivo gene transfer", *Biochem Biophys Res Commun* **233**, 45 (1997).
- [131] M. SATO, M. TANIGAWA, N. KIKUCHI, S. NAKAMURA, ET M. KIMURA, "Efficient gene delivery into murine ovarian cells by intraovarian injection of plasmid DNA and subsequent in vivo electroporation", *Genesis* **35**, 169 (2003).
- [132] K. BLAIR-PARKS, B. C. WESTON, ET D. A. DEAN, "High-level gene transfer to the cornea using electroporation", *J Gene Med* **4**, 92 (2002).
- [133] Y. OSHIMA, T. SAKAMOTO, T. HISATOMI, C. TSUTSUMI, Y. SASSA, T. ISHIBASHI, ET H. INOMATA, "Targeted gene transfer to corneal stroma in vivo by electric pulses", *Exp Eye Res* **74**, 191 (2002).
- [134] M. DEZAWA, M. TAKANO, H. NEGISHI, X. MO, T. OSHITARI, ET H. SAWADA, "Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation : a new approach", *Micron* **33**, 1 (2002).
- [135] T. MATSUDA ET C. L. CEPKO, "Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro", *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16 (2004).
- [136] K. MAMIYA, H. OHGURO, I. OHGURO, T. METOKI, F. ISHIKAWA, H. YAMAZAKI, Y. TAKANO, T. ITO, ET M. NAKAZAWA, "Effects of matrix metalloproteinase-3 gene transfer by electroporation in glaucoma filter surgery", *Exp Eye Res* **79**, 405 (2004).
- [137] C. R. LIN, M. H. TAI, J. T. CHENG, A. K. CHOU, J. J. WANG, P. H. TAN, M. MARSALA, ET L. C. YANG, "Electroporation for direct spinal gene transfer in rats", *Neurosci Lett* **317**, 1 (2002).
- [138] E. TUPIN, B. POIRIER, M. F. BUREAU, J. KHALLOU-LASCHET, R. VRANCKX, G. CALIGIURI, A. T. GASTON, J. P. DUONG VAN HUYEN, D. SCHERMAN, J. BARIETY, J. B. MICHEL, ET A. NICOLETTI, "Non-viral gene transfer of murine spleen cells achieved by in vivo electroporation", *Gene Ther* **10**, 569 (2003).
- [139] M. OTANI, M. YOSHIDA, H. IWASHITA, Y. KAWANO, K. MIYAMAE, A. INADOME, T. NISHI, ET S. UEDA, "Electroporation-mediated muscarinic M receptor gene transfer into rat urinary bladder", *Int J Urol* **11**, 1001 (2004).
- [140] L. M. MIR *et al.*, "Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy", *Br J Cancer* **77**, 2336 (1998).
- [141] H. AIHARA ET J. MIYAZAKI, "Gene transfer into muscle by electroporation in vivo", *Nat Biotechnol* **16**, 867 (1998).
- [142] I. MATHIESEN, "Electropermeabilization of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo", *Gene Ther* **6**, 508 (1999).
- [143] Q. L. LU, G. BOU-GHARIOS, ET T. A. PARTRIDGE, "Non-viral gene delivery in skeletal muscle : a protein factory", *Gene Ther* **10**, 131 (2003).
- [144] G. GOLDSPIK, "Skeletal muscle as an artificial endocrine tissue", *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **17**, 211 (2003).
- [145] M. BETTAN, F. EMMANUEL, R. DARTEIL, J. M. CAILLAUD, F. SOUBRIER, P. DELAERE, D. BRANELEC, A. MAHFOUDI, N. DUVERGER, ET D. SCHERMAN, "High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle", *Mol Ther* **2**, 204 (2000).
- [146] P. KREISS, M. BETTAN, J. CROUZET, ET D. SCHERMAN, "Erythropoietin secretion and physiological effect in mouse after intramuscular plasmid DNA electrotransfer.", *The Journal of Gene Medicine* **1**, 245 (1999).
- [147] N. PEREZ, P. BIGEY, D. SCHERMAN, O. DANOS, M. PIECHACZYK, ET M. PELEGRIN, "Regulatable systemic production of monoclonal antibodies by in vivo muscle electroporation", *Genet Vaccines Ther* **2**, 2 (2004).
- [148] S. S. FAKHARZADEH, Y. ZHANG, R. SARKAR, ET J. KAZAZIAN, H. H., "Correction of the coagulation defect in hemophilia A mice through factor VIII expression in skin", *Blood* **95**, 2799 (2000).
- [149] J. KANITAKIS, "Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin", *Eur J Dermatol* **12**, 390 (2002).
- [150] A. JADOUL, J. BOUWSTRA, ET V. V. PREAT, "Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum. Review of the biophysical studies", *Adv Drug Deliv Rev* **35**, 89 (1999).
- [151] A. R. DENET, R. VANBEVER, ET V. PREAT, "Skin electroporation for transdermal and topical delivery", *Adv Drug Deliv Rev* **56**, 659 (2004).
- [152] K. K. PEACHMAN, M. RAO, ET C. R. ALVING, "Immunization with DNA through the skin", *Methods* **31**, 232 (2003).

- [153] J. J. DRABICK, J. GLASSPOOL-MALONE, A. KING, ET R. W. MALONE, "Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by in vivo electroporation", *Mol Ther* **3**, 249 (2001).
- [154] N. DUJARDIN, E. STAES, Y. KALIA, P. CLARYS, R. GUY, ET V. PREAT, "In vivo assessment of skin electroporation using square wave pulses", *J Control Release* **79**, 219 (2002).
- [155] S. SAMAKOGLU, E. FATTORI, S. LAMARTINA, C. TONIATTI, D. STOCKHOLM, J. M. HEARD, ET D. BOHL, "betaMinor-globin messenger RNA accumulation in reticulocytes governs improved erythropoiesis in beta thalassemic mice after erythropoietin complementary DNA electrotransfer in muscles", *Blood* **97**, 2213 (2001).
- [156] E. PAYEN, M. BETTAN, P. ROUYER-FESSARD, Y. BEUZARD, ET D. SCHERMAN, "Improvement of mouse beta-thalassemia by electrotransfer of erythropoietin cDNA", *Exp Hematol* **29**, 295 (2001).
- [157] O. ADACHI, A. NAKANO, O. SATO, S. KAWAMOTO, H. TAHARA, N. TOYODA, E. YAMATO, A. MATSUMORI, K. TABAYASHI, ET J. MIYAZAKI, "Gene transfer of Fc-fusion cytokine by in vivo electroporation : application to gene therapy for viral myocarditis", *Gene Ther* **9**, 577 (2002).
- [158] K. WATANABE, M. NAKAZAWA, K. FUSE, H. HANAWA, M. KODAMA, Y. AIZAWA, T. OHNUKI, F. GEJYO, H. MARUYAMA, ET J. MIYAZAKI, "Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin-10 by electroporation", *Circulation* **104**, 1098 (2001).
- [159] Z. MALLAT *et al.*, "Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis", *Circ Res* **85**, e17 (1999).
- [160] F. XUE, T. TAKAHARA, Y. YATA, M. MINEMURA, C. Y. MORIOKA, S. TAKAHARA, E. YAMATO, K. DONO, ET A. WATANABE, "Attenuated acute liver injury in mice by naked hepatocyte growth factor gene transfer into skeletal muscle with electroporation", *Gut* **50**, 558 (2002).
- [161] G. J. PRUD'HOMME, Y. CHANG, ET X. LI, "Immunoinhibitory DNA vaccine protects against autoimmune diabetes through cDNA encoding a selective CTLA-4 (CD152) ligand", *Hum Gene Ther* **13**, 395 (2002).
- [162] Y. C. LONG, S. JAICHANDRAN, L. P. HO, S. L. TIEN, S. Y. TAN, ET O. L. KON, "FVIII gene delivery by muscle electroporation corrects murine hemophilia A", *J Gene Med* (2004).
- [163] N. PEREZ, P. PLENCE, V. MILLET, D. GREUET, C. MINOT, D. NOEL, O. DANOS, C. JORGENSEN, ET F. APPARAILLY, "Tetracycline transcriptional silencer tightly controls transgene expression after in vivo intramuscular electrotransfer : application to interleukin 10 therapy in experimental arthritis", *Hum Gene Ther* **13**, 2161 (2002).
- [164] N. SAIDENBERG-KERMANAC'H, N. BESSIS, V. DELEUZE, C. BLOQUEL, M. BUREAU, D. SCHERMAN, ET M. C. BOISSIER, "Efficacy of interleukin-10 gene electrotransfer into skeletal muscle in mice with collagen-induced arthritis", *J Gene Med* **5**, 164 (2003).
- [165] S. H. HO, W. HAHN, H. J. LEE, D. S. KIM, J. G. JEONG, S. KIM, S. S. YU, E. S. JEON, ET J. M. KIM, "Protection against collagen-induced arthritis by electrotransfer of an expression plasmid for the interleukin-4", *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 759 (2004).
- [166] J. M. KIM, S. H. HO, W. HAHN, J. G. JEONG, E. J. PARK, H. J. LEE, S. S. YU, C. S. LEE, Y. W. LEE, ET S. KIM, "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* **10**, 1216 (2003).
- [167] C. BLOQUEL, N. BESSIS, M. C. BOISSIER, D. SCHERMAN, ET P. BIGEY, "Gene therapy of collagen-induced arthritis by electrotransfer of human tumor necrosis factor-alpha soluble receptor I variants", *Hum Gene Ther* **15**, 189 (2004).
- [168] J. G. JEONG, J. M. KIM, S. H. HO, W. HAHN, S. S. YU, ET S. KIM, "Electrotransfer of human IL-1Ra into skeletal muscles reduces the incidence of murine collagen-induced arthritis", *J Gene Med* **6**, 1125 (2004).
- [169] J. M. BAKKER, W. K. BLEEKER, ET P. W. PARREN, "Therapeutic antibody gene transfer : an active approach to passive immunity", *Mol Ther* **10**, 411 (2004).
- [170] J. T. VILQUIN, P. F. KENNEL, M. PATURNEAU-JOUAS, P. CHAPDELAIN, N. BOISSEL, P. DELAERE, J. P. TREMBLAY, D. SCHERMAN, M. Y. FISZMAN, ET K. SCHWARTZ, "Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies", *Gene Ther* **8**, 1097 (2001).
- [171] T. MURAKAMI, T. NISHI, E. KIMURA, T. GOTO, Y. MAEDA, Y. USHIO, M. UCHINO, ET Y. SUNADA, "Full-length dystrophin cDNA transfer into skeletal muscle of adult mdx mice by electroporation", *Muscle Nerve* **27**, 237 (2003).
- [172] H. GOLLINS, J. MCMAHON, K. E. WELLS, ET D. J. WELLS, "High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle", *Gene Ther* **10**, 504 (2003).

- [173] D. C. TANG, M. DEVIT, ET S. A. JOHNSTON, "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response", *Nature* **356**, 152 (1992).
- [174] J. B. ULMER, J. J. DONNELLY, S. E. PARKER, G. H. RHODES, P. L. FELGNER, V. J. DWARKI, S. H. GROMKOWSKI, R. R. DECK, C. M. DEWITT, ET A. FRIEDMAN, "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein", *Science* **259**, 1745 (1993).
- [175] S. GURUNATHAN, D. M. KLINMAN, ET R. A. SEDER, "DNA vaccines : immunology, application, and optimization*", *Annu Rev Immunol* **18**, 927 (2000).
- [176] A. QUINN, W. JIANG, M. VELAZ-FAIRCLOTH, A. J. COBB, S. C. HENRY, ET R. FROTHINGHAM, "In vivo protein expression and immune responses generated by DNA vaccines expressing mycobacterial antigens fused with a reporter protein", *Vaccine* **20**, 3187 (2002).
- [177] H. L. DAVIS, C. L. MILLAN, ET S. C. WATKINS, "Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA", *Gene Ther* **4**, 181 (1997).
- [178] D. L. LODMELL, M. J. PARNELL, J. T. WEYHRICH, ET L. C. EWALT, "Canine rabies DNA vaccination : a single-dose intradermal injection into ear pinnae elicits elevated and persistent levels of neutralizing antibody", *Vaccine* **21**, 3998 (2003).
- [179] R. A. HALL, D. J. NISBET, K. B. PHAM, A. T. PYKE, G. A. SMITH, ET A. A. KHROMYKH, "DNA vaccine coding for the full-length infectious Kunjin virus RNA protects mice against the New York strain of West Nile virus", *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10460 (2003).
- [180] K. KURATSUKURI, C. Y. WANG, T. SONE, N. NISHISAKA, R. F. JONES, ET G. P. HAAS, "Induction of antibodies against prostate-specific membrane antigen (PSMA) by vaccination with a PSMA DNA vector", *Eur Urol* **42**, 67 (2002).
- [181] S. ZUCHELLI, S. CAPONE, E. FATTORI, A. FOLGORI, A. DI MARCO, D. CASIMIRO, A. J. SIMON, R. LAUFER, N. LA MONICA, R. CORTESE, ET A. NICOSIA, "Enhancing B- and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer", *J Virol* **74**, 11598 (2000).
- [182] W. L. MCCLEMENTS, M. E. ARMSTRONG, R. D. KEYS, ET M. A. LIU, "The prophylactic effect of immunization with DNA encoding herpes simplex virus glycoproteins on HSV-induced disease in guinea pigs", *Vaccine* **15**, 857 (1997).
- [183] P. J. LEWIS, H. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN, ET L. A. BABIUK, "Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response", *J Virol* **73**, 10214 (1999).
- [184] J. HINKULA, P. LUNDHOLM, ET B. WAHREN, "Nucleic acid vaccination with HIV regulatory genes : a combination of HIV-1 genes in separate plasmids induces strong immune responses", *Vaccine* **15**, 874 (1997).
- [185] J. T. QIU, B. LIU, C. TIAN, G. N. PAVLAKIS, ET X. F. YU, "Enhancement of primary and secondary cellular immune responses against human immunodeficiency virus type 1 gag by using DNA expression vectors that target Gag antigen to the secretory pathway", *J Virol* **74**, 5997 (2000).
- [186] J. B. ULMER, T. M. FU, R. R. DECK, A. FRIEDMAN, L. GUAN, C. DEWITT, X. LIU, S. WANG, M. A. LIU, J. J. DONNELLY, ET M. J. CAULFIELD, "Protective CD4+ and CD8+ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA", *J Virol* **72**, 5648 (1998).
- [187] M. BACHY, F. BOUDET, M. BUREAU, Y. GIRERD-CHAMBAZ, P. WILS, D. SCHERMAN, ET C. MERIC, "Electric pulses increase the immunogenicity of an influenza DNA vaccine injected intramuscularly in the mouse", *Vaccine* **19**, 1688 (2001).
- [188] K. U. SAIKH, J. SESNO, P. BRANDLER, ET R. G. ULRICH, "Are DNA-based vaccines useful for protection against secreted bacterial toxins? Tetanus toxin test case", *Vaccine* **16**, 1029 (1998).
- [189] V. L. BONATO, V. M. LIMA, R. E. TASCONE, D. B. LOWRIE, ET C. L. SILVA, "Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-infected mice", *Infect Immun* **66**, 169 (1998).
- [190] S. TOLLEFSEN, T. TJELLE, J. SCHNEIDER, M. HARBOE, H. WIKER, G. HEWINSON, K. HUYGEN, ET I. MATHIESEN, "Improved cellular and humoral immune responses against Mycobacterium tuberculosis antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation", *Vaccine* **20**, 3370 (2002).
- [191] T. P. LE *et al.*, "Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers", *Vaccine* **18**, 1893 (2000).
- [192] L. A. BABIUK, R. PONTAROLLO, S. BABIUK, B. LOEHR, ET S. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, "Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals", *Vaccine* **21**, 649 (2003).

- [193] M. DUPUIS, K. DENIS-MIZE, C. WOO, C. GOLDBECK, M. J. SELBY, M. CHEN, G. R. OTTEN, J. B. ULMER, J. J. DONNELLY, G. OTT, ET D. M. McDONALD, "Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice", *J Immunol* **165**, 2850 (2000).
- [194] A. H. LEE, Y. S. SUH, J. H. SUNG, S. H. YANG, ET Y. C. SUNG, "Comparison of various expression plasmids for the induction of immune response by DNA immunization", *Mol Cells* **7**, 495 (1997).
- [195] J. R. KIRMAN ET R. A. SEDER, "DNA vaccination : the answer to stable, protective T-cell memory?", *Curr Opin Immunol* **15**, 471 (2003).
- [196] L. YANG, N. CHEONG, D. Y. WANG, B. W. LEE, I. C. KUO, C. H. HUANG, ET K. Y. CHUA, "Generation of monoclonal antibodies against Blo t 3 using DNA immunization with in vivo electroporation", *Clin Exp Allergy* **33**, 663 (2003).
- [197] S. LI, X. XIA, X. ZHANG, ET J. SUEN, "Regression of tumors by IFN-alpha electroporation gene therapy and analysis of the responsible genes by cDNA array", *Gene Ther* **9**, 390 (2002).
- [198] M. L. LUCAS, L. HELLER, D. COPPOLA, ET R. HELLER, "IL-12 plasmid delivery by in vivo electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma", *Mol Ther* **5**, 668 (2002).
- [199] T. KISHIDA, H. ASADA, E. SATOH, S. TANAKA, M. SHINYA, H. HIRAI, M. IWAI, H. TAHARA, J. IMANISHI, ET O. MAZDA, "In vivo electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice", *Gene Ther* **8**, 1234 (2001).
- [200] T. TAMURA, T. NISHI, T. GOTO, H. TAKESHIMA, S. B. DEV, Y. USHIO, ET T. SAKATA, "Intratumoral delivery of interleukin 12 expression plasmids with in vivo electroporation is effective for colon and renal cancer", *Hum Gene Ther* **12**, 1265 (2001).
- [201] T. TAMURA, T. NISHI, T. GOTO, H. TAKESHIMA, Y. USHIO, ET T. SAKATA, "Combination of IL-12 and IL-18 of electro-gene therapy synergistically inhibits tumor growth", *Anticancer Res* **23**, 1173 (2003).
- [202] T. GOTO, T. NISHI, T. TAMURA, S. B. DEV, H. TAKESHIMA, M. KOCHI, K. YOSHIZATO, J. KURATSU, T. SAKATA, G. A. HOFMANN, ET Y. USHIO, "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* **97**, 354 (2000).
- [203] M. A. SHIBATA, J. MORIMOTO, ET Y. OTSUKI, "Suppression of murine mammary carcinoma growth and metastasis by HSVtk/GCV gene therapy using in vivo electroporation", *Cancer Gene Ther* **9**, 16 (2002).
- [204] Y. YAMASHITA, M. SHIMADA, S. TANAKA, M. OKAMAMOTO, J. MIYAZAKI, ET K. SUGIMACHI, "Electroporation-mediated tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L gene therapy for hepatocellular carcinoma", *Hum Gene Ther* **13**, 275 (2002).
- [205] M. Y. CELIKER, M. WANG, E. ATSIDAFTOS, X. LIU, Y. E. LIU, Y. JIANG, E. VALDERRAMA, I. D. GOLDBERG, ET Y. E. SHI, "Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA", *Oncogene* **20**, 4337 (2001).
- [206] M. BABA, H. IISHI, ET M. TATSUTA, "Transfer of bcl-xs plasmid is effective in preventing and inhibiting rat hepatocellular carcinoma induced by N-nitrosomorpholine", *Gene Ther* **8**, 1149 (2001).
- [207] C. BOSSARD, L. VAN DEN BERGHE, H. LAURELL, C. CASTANO, M. CERUTTI, A. C. PRATS, ET H. PRATS, "Antiangiogenic properties of fibstatin, an extracellular FGF-2-binding polypeptide", *Cancer Res* **64**, 7507 (2004).
- [208] T. TAMURA ET T. SAKATA, "Application of in vivo electroporation to cancer gene therapy", *Curr Gene Ther* **3**, 59 (2003).
- [209] M. TAWK, D. TUILL, Y. TORRENTE, S. VRIZ, ET D. PAULIN, "High-efficiency gene transfer into adult fish : a new tool to study fin regeneration", *Genesis* **32**, 27 (2002).
- [210] M. RAO, J. H. BARABAN, F. RAJAI, ET S. SOCKANATHAN, "In vivo comparative study of RNAi methodologies by in ovo electroporation in the chick embryo", *Dev Dyn* **231**, 592 (2004).
- [211] V. PEKARIK, D. BOURIKAS, N. MIGLINO, P. JOSET, S. PREISWERK, ET E. T. STOECKLI, "Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation", *Nat Biotechnol* **21**, 93 (2003).
- [212] Y. KONISHI, J. STEGMULLER, T. MATSUDA, S. BONNI, ET A. BONNI, "Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain", *Science* **303**, 1026 (2004).
- [213] T. KISHIDA, H. ASADA, S. GOJO, S. OHASHI, M. SHIN-YA, K. YASUTOMI, R. TERAUCHI, K. A. TAKAHASHI, T. KUBO, J. IMANISHI, ET O. MAZDA, "Sequence-specific gene silencing in murine muscle induced by electroporation-mediated transfer of short interfering RNA", *J Gene Med* **6**, 105 (2004).
- [214] M. GOLZIO, L. MAZZOLINI, P. MOLLER, M. P. ROLS, ET J. TEISSIE, "Inhibition of gene expression in mice muscle by in vivo electrically mediated siRNA delivery", *Gene Ther* **12**, 246 (2005).

- [215] C. E. KRULL, "A primer on using in ovo electroporation to analyze gene function", *Dev Dyn* **229**, 433 (2004).
- [216] S. LAMARTINA, G. ROSCILLI, C. D. RINAUDO, E. SPORENO, L. SILVI, W. HILLEN, H. BUJARD, R. CORTESE, G. CILIBERTO, ET C. TONIATTI, "Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators", *Hum Gene Ther* **13**, 199 (2002).
- [217] C. TROLLET, M. IBANEZ-RUIZ, C. BLOQUEL, G. VALIN, D. SCHERMAN, ET P. BIGEY, "Regulation of gene expression using a conditional RNA antisense strategy.", *J. Genome Sci.Tech.* **3**, 1 (2004).
- [218] A. YAMAMOTO, R. HEN, ET W. T. DAUER, "The Ons and Offs of inducible transgenic Tehnology : A review.", *Neurobiology of Disease* **8**, 923 (2001).
- [219] C. M. BACKMAN, Y. ZHANG, B. J. HOFFER, ET A. C. TOMAC, "Tetracycline-inducible expression systems for the generation of transgenic animals : a comparison of various inducible systems carried in a single vector", *J Neurosci Methods* **139**, 257 (2004).
- [220] K. Y. JEN ET A. M. GEWIRTZ, "Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA : available options and current strategies", *Stem Cells* **18**, 307 (2000).
- [221] T. V. ACHENBACH, B. BRUNNER, ET K. HEERMEIER, "Oligonucleotide-based knockdown technologies : antisense versus RNA interference", *Chembiochem* **4**, 928 (2003).
- [222] B. JANSEN ET U. ZANGEMEISTER-WITTKE, "Antisense therapy for cancer—the time of truth", *Lancet Oncol* **3**, 672 (2002).
- [223] J. D. MARTH, "Recent advances in gene mutagenesis by site-directed recombination", *J Clin Invest* **97**, 1999 (1996).
- [224] R. MORISHITA, G. H. GIBBONS, M. HORIUCHI, K. E. ELLISON, M. NAKAMA, L. ZHANG, Y. KANEDA, T. OGIHARA, ET V. J. DZAU, "A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo", *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5855 (1995).
- [225] B. WEISS, G. DAVIDKOVA, ET L. W. ZHOU, "Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes", *Cell Mol Life Sci* **55**, 334 (1999).
- [226] X. B. SHI, P. H. GUMERLOCK, J. T. MUENZER, ET R. W. DEVERE WHITE, "BCL2 antisense transcripts decrease intracellular Bcl2 expression and sensitize LNCaP prostate cancer cells to apoptosis-inducing agents", *Cancer Biother Radiopharm* **16**, 421 (2001).
- [227] N. DIAS ET C. A. STEIN, "Antisense oligonucleotides : basic concepts and mechanisms", *Mol Cancer Ther* **1**, 347 (2002).
- [228] L. V. RAVICHANDRAN, N. M. DEAN, ET E. G. MARCUSSON, "Use of antisense oligonucleotides in functional genomics and target validation", *Oligonucleotides* **14**, 49 (2004).
- [229] U. KOPPELHUS ET P. E. NIELSEN, "Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA)", *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 267 (2003).
- [230] A. DOVE, "Antisense and sensibility", *Nat Biotechnol* **20**, 121 (2002).
- [231] J.-J. TOULMÉ ET R. GIEGÉ, "Les aptamères : des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection in vitro.", *médecine/sciences* **14**, 155 (1998).
- [232] D. A. SAMARSKY, G. FERBEYRE, E. BERTRAND, R. H. SINGER, R. CEDERGREN, ET M. J. FOURNIER, "A small nucleolar RNA :ribozyme hybrid cleaves a nucleolar RNA target in vivo with near-perfect efficiency", *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6609 (1999).
- [233] M. FUSSENEGGER, "The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies.", *Biotechnol Prog* **17**, 1 (2001).
- [234] C. TONIATTI, H. BUJARD, R. CORTESE, ET G. CILIBERTO, "Gene therapy progress and prospects : transcription regulatory systems", *Gene Ther* **11**, 649 (2004).
- [235] F. M. WURM, K. A. GWINN, ET R. E. KINGSTON, "Inducible overproduction of the mouse c-myc protein in mammalian cells", *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5414 (1986).
- [236] P. J. RATCLIFFE, J. F. O'ROURKE, P. H. MAXWELL, ET C. W. PUGH, "Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression", *J Exp Biol* **201**, 1153 (1998).
- [237] A. W. VARLEY, S. M. GEISZLER, R. B. GAYNOR, ET R. S. MUNFORD, "A two-component expression system that responds to inflammatory stimuli in vivo", *Nat Biotechnol* **15**, 1002 (1997).
- [238] K. E. MAYO, R. WARREN, ET R. D. PALMITER, "The mouse metallothionein-I gene is transcriptionally regulated by cadmium following transfection into human or mouse cells", *Cell* **29**, 99 (1982).

- [239] M. GOSSEN ET H. BUJARD, "Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 5547 (1992).
- [240] P. FURTH, L. ONGE, H. BOGER, P. GRUSS, M. GOSSEN, A. KISTNER, H. BUJARD, ET L. HENNIGHAUSEN, "Temporal Control of Gene Expression in Transgenic Mice by a Tetracycline- Responsive Promoter", *PNAS* **91**, 9302 (1994).
- [241] D. BOHL, N. NAFFAKH, ET J. HEARD, "Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts.", *Nature Medicine* **3**, 299 (1997).
- [242] M. GOSSEN, S. FREUNDLIEB, G. BENDER, G. MULLER, W. HILLEN, ET H. BUJARD, "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells", *Science* **268**, 1766 (1995).
- [243] A. KISTNER, M. GOSSEN, F. ZIMMERMANN, J. JERECIC, C. ULLMER, H. LUBBERT, ET H. BUJARD, "Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice", *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10933 (1996).
- [244] C. SERGUERA, D. BOHL, E. ROLLAND, P. PREVOST, ET J. M. HEARD, "Control of erythropoietin secretion by doxycycline or mifepristone in mice bearing polymer-encapsulated engineered cells", *Hum Gene Ther* **10**, 375 (1999).
- [245] D. BOHL, A. SALVETTI, P. MOULLIER, ET J. M. HEARD, "Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector", *Blood* **92**, 1512 (1998).
- [246] S. URLINGER, U. BARON, M. THELLMANN, M. T. HASAN, H. BUJARD, ET W. HILLEN, "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators : novel mutations yield expanded range and sensitivity", *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7963 (2000).
- [247] L. AURISICCHIO, H. BUJARD, W. HILLEN, R. CORTESE, G. CILIBERTO, N. LA MONICA, ET F. PALOMBO, "Regulated and prolonged expression of mIFN(alpha) in immunocompetent mice mediated by a helper-dependent adenovirus vector", *Gene Ther* **8**, 1817 (2001).
- [248] J. K. KOPONEN, H. KANKKONEN, J. KANNASTO, T. WIRTH, W. HILLEN, H. BUJARD, ET S. YLA-HERTTUALA, "Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo", *Gene Ther* **10**, 459 (2003).
- [249] S. FREUNDLIEB, C. SCHIRRA-MULLER, ET H. BUJARD, "A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells", *J Gene Med* **1**, 4 (1999).
- [250] L. H. MCGEE SANFTNER, K. G. RENDAHL, D. QUIROZ, M. COYNE, M. LADNER, W. C. MANNING, ET J. G. FLANNERY, "Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina", *Mol Ther* **3**, 688 (2001).
- [251] V. SALUCCI, A. SCARITO, L. AURISICCHIO, S. LAMARTINA, G. NICOLAUS, S. GIAMPAOLI, O. GONZALEZ-PAZ, C. TONIATTI, H. BUJARD, W. HILLEN, G. CILIBERTO, ET F. PALOMBO, "Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system", *Gene Ther* **9**, 1415 (2002).
- [252] S. LAMARTINA *et al.*, "Construction of an rtTA2(s)-m2/tts(kid)-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates", *Mol Ther* **7**, 271 (2003).
- [253] H. MIZUGUCHI, Z. L. XU, F. SAKURAI, T. MAYUMI, ET T. HAYAKAWA, "Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing the rtTA and tTS expression cassettes in separate genome regions", *Hum Gene Ther* **14**, 1265 (2003).
- [254] D. NO, T. YAO, ET R. EVANS, "Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 3346 (1996).
- [255] H. E. THOMAS, H. G. STUNNENBERG, ET A. F. STEWART, "Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle", *Nature* **362**, 471 (1993).
- [256] K. S. CHRISTOPHERSON, M. R. MARK, V. BAJAJ, ET P. J. GODOWSKI, "Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators", *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6314 (1992).
- [257] J. P. DELORT ET M. R. CAPECCHI, "TAXI/UAS : A molecular switch to control expression of genes in vivo", *Hum Gene Ther* **7**, 809 (1996).
- [258] Y. WANG, J. O'MALLEY, B. W., S. Y. TSAI, ET B. W. O'MALLEY, "A regulatory system for use in gene transfer", *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8180 (1994).

- [259] Y. WANG, F. J. DEMAYO, S. Y. TSAI, ET B. W. O'MALLEY, "Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice", *Nat Biotechnol* **15**, 239 (1997).
- [260] Y. WANG, F. J. DEMAYO, S. Y. TSAI, ET B. W. O'MALLEY, "Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice", *Nat Biotechnol* **15**, 239 (1997).
- [261] M. M. BURCIN, G. SCHIEDNER, S. KOCHANNEK, S. Y. TSAI, ET B. W. O'MALLEY, "Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo", *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 355 (1999).
- [262] V. M. RIVERA, T. CLACKSON, S. NATESAN, R. POLLOCK, J. F. AMARA, T. KEENAN, S. R. MAGARI, T. PHILLIPS, N. L. COURAGE, J. CERASOLI, F., D. A. HOLT, ET M. GILMAN, "A humanized system for pharmacologic control of gene expression", *Nat Med* **2**, 1028 (1996).
- [263] X. YE, V. M. RIVERA, P. ZOLTICK, J. CERASOLI, F., M. A. SCHNELL, G. GAO, J. V. HUGHES, M. GILMAN, ET J. M. WILSON, "Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer", *Science* **283**, 88 (1999).
- [264] V. M. RIVERA, X. YE, N. L. COURAGE, J. SACHAR, J. CERASOLI, F., J. M. WILSON, ET M. GILMAN, "Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer", *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8657 (1999).
- [265] S. D. LIBERLES, S. T. DIVER, D. J. AUSTIN, ET S. L. SCHREIBER, "Inducible gene expression and protein translocation using nontoxic ligands identified by a mammalian three-hybrid screen", *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7825 (1997).
- [266] R. POLLOCK ET T. CLACKSON, "Dimerizer-regulated gene expression", *Curr Opin Biotechnol* **13**, 459 (2002).
- [267] K. LUNDSTROM, "Latest development in viral vectors for gene therapy", *Trends Biotechnol* **21**, 117 (2003).
- [268] J. SAMBROOK, E. FRITSCH, ET T. MANIATIS, "Molecular cloning", *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **1**, 1 (1989).
- [269] F. SOUBRIER *et al.*, "pCOR : a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy.", *Gene Therapy* **6**, 1482 (1999).
- [270] M. BETTAN, R. DARTEIL, ET D. SCHERMAN, "Secreted human placental alkaline phosphatase as a reporter gene for in vivo gene transfer", *Anal Biochem* **271**, 187 (1999).
- [271] B. SHERF ET K. WOOD, "Firefly Luciferase Engineered for Improved Genetic Reporting", *Promega Notes Magazine* **49**, 14 (1994).
- [272] V. ESCRIOU, M. CARRIERE, F. BUSSONE, P. WILS, ET D. SCHERMAN, "Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer.", *J Gene Med* **3**, 179 (2001).
- [273] P. CHOMCZYNSKI ET N. SACCHI, "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.", *Analytical Biochemistry* **162**, 156 (1987).
- [274] G. BYK, C. DUBERTRET, V. ESCRIOU, M. FREDERIC, G. JASLIN, R. RANGARA, B. PITARD, J. CROUZET, P. WILS, B. SCHWARTZ, ET D. SCHERMAN, "Synthesis, activity, and structure-activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer.", *Journal of Medicinal Chemistry* **41**, 229 (1998).
- [275] V. ESCRIOU, C. CIOLINA, F. LACROIX, G. BYK, D. SCHERMAN, ET P. WILS, "Cationic lipid-mediated gene transfer : effect of serum on cellular uptake and intracellular fate of lipopolyamine/DNA complexes", *Biochimica Et Biophysica Acta* **1368**, 276 (1998).
- [276] J. BERGER, J. HAUBER, R. HAUBER, R. GEIGER, ET B. R. CULLEN, "Secreted placental alkaline phosphatase : a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells", *Gene* **66**, 1 (1988).
- [277] KOEPKE, "Microhematocrit method", *Practical Laboratory Hematology* **1**, 112 (1991).
- [278] A. HONIGMAN *et al.*, "Imaging transgene expression in live animals", *Mol Ther* **4**, 239 (2001).
- [279] A. BOGDANOV ET R. WEISSLEDER, "In vivo imaging of gene delivery and expression", *Trends Biotechnol* **20**, S11 (2002).
- [280] M. GOLZIO, M. P. ROLS, B. GABRIEL, ET J. TEISSIE, "Optical imaging of in vivo gene expression : a critical assessment of the methodology and associated technologies", *Gene Ther* **11 Suppl 1**, S85 (2004).
- [281] S. G. GOULD, G. A. KELLER, ET S. SUBRAMANI, "Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase", *J Cell Biol* **105**, 2923 (1987).
- [282] M. V. MATZ, A. F. FRADKOV, Y. A. LABAS, A. P. SAVITSKY, A. G. ZARAISKY, M. L. MARKELOV, ET S. A. LUKYANOV, "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species", *Nat Biotechnol* **17**, 969 (1999).
- [283] T. W. DUBENSKY, B. A. CAMPBELL, ET L. P. VILLARREAL, "Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice", *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7529 (1984).

- [284] H. MADRY ET S. B. TRIPPEL, "Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes", *Gene Ther* **7**, 286 (2000).
- [285] J. B. OPALINSKA ET A. M. GEWIRTZ, "Nucleic-acid therapeutics : basic principles and recent applications", *Nat Rev Drug Discov* **1**, 503 (2002).
- [286] M. KANG, K. KIM, J. SEOL, K. KIM, ET M. NAM, "The growth inhibition of hepatoma by gene transfer of antisense vascular endothelial growth factor.", *J Gene Med* **2**, 1 (2000).
- [287] X. ZHANG, Z. CHEN, Y. CHEN, ET T. TONG, "Delivering antisense telomerase RNA by a hybrid adeno-virus/ adeno-associated virus significantly suppresses the malignant phenotype and enhances cell apoptosis of human breast cancer cells.", *Oncogene* **22**, 2405 (2003).
- [288] A. SLACK, V. BOVENZI, P. BIGEY, M. A. IVANOV, S. RAMCHANDANI, S. BHATTACHARYA, B. TENOEVER, B. LAMRIHI, D. SCHERMAN, ET M. SZYF, "Antisense MBD2 gene therapy inhibits tumorigenesis", *J Gene Med* **4**, 381 (2002).
- [289] M. MCCALL, "Repressible antisense inhibition in B lymphocytes", *Biochim Biophys Acta* **1397**, 65 (1998).
- [290] A. T. BEGGAH, B. ESCOUBET, S. PUTTINI, S. CAILMAIL, V. DELAGE, A. OUVREARD-PASCAUD, B. BOCCHI, M. PEUCHMAUR, C. DELCAYRE, N. FARMAN, ET F. JAISSER, "From the Cover : Reversible cardiac fibrosis and heart failure induced by conditional expression of an antisense mRNA of the mineralocorticoid receptor in cardiomyocytes", *PNAS* **99**, 7160 (2002).
- [291] H. LOTTMANN, J. VANSELOW, B. HESSABI, ET R. WALTHER, "The Tet-On system in transgenic mice : inhibition of the mouse pdx-1 gene activity by antisense RNA expression in pancreatic beta-cells.", *J Mol Med* **79**, 321 (2000).
- [292] L. T. GOODNOUGH, B. SKIKNE, ET C. BRUGNARA, "Erythropoietin, iron, and erythropoiesis", *Blood* **96**, 823 (2000).
- [293] D. BOHL, A. BOSCH, A. CARDONA, A. SALVETTI, ET J. M. HEARD, "Improvement of erythropoiesis in beta-thalassemic mice by continuous erythropoietin delivery from muscle", *Blood* **95**, 2793 (2000).
- [294] G. M. ARNDT ET G. H. RANK, "Colocalization of antisense RNAs and ribozymes with their target mRNAs", *Genome* **40**, 785 (1997).
- [295] V. K. GADI, N. ZOU, J. S. LIU, S. CHENG, T. R. BROKER, E. J. SORSCHER, ET L. T. CHOW, "Components of human papillomavirus that activate transcription and support plasmid replication in human airway cells", *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**, 1001 (1999).
- [296] D. MARTEL-RENOIR, V. TROCHON-JOSEPH, A. GALAUP, C. BOUQUET, F. GRISCELLI, P. OPOLON, D. OPOLON, E. CONNAULT, L. MIR, ET M. PERRICAUDET, "Coelectrotransfer to skeletal muscle of three plasmids coding for antiangiogenic factors and regulatory factors of the tetracycline-inducible system : tightly regulated expression, inhibition of transplanted tumor growth, and antimetastatic effect", *Mol Ther* **8**, 425 (2003).
- [297] M. LATTA-MAHIEU, M. ROLLAND, C. CAILLET, M. WANG, P. KENNEL, I. MAHFOUZ, I. LOQUET, J. F. DEDIEU, A. MAHFOUDI, E. TRANNOY, ET V. THUILLIER, "Gene transfer of a chimeric trans-activator is immunogenic and results in short-lived transgene expression", *Hum Gene Ther* **13**, 1611 (2002), 1043-0342 Journal Article.
- [298] D. FAVRE *et al.*, "Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus", *J Virol* **76**, 11605 (2002).
- [299] P. RICHARD, H. POLLARD, C. LANCTIN, M. BELLO-ROUFAL, L. DESIGAUX, D. ESCANDE, ET B. PITARD, "Inducible production of erythropoietin using intramuscular injection of block copolymer/DNA formulation", *J Gene Med* **7**, 80 (2005).
- [300] A. M. LENA, P. GIANNETTI, E. SPORENO, G. CILIBERTO, ET R. SAVINO, "Immune responses against tetracycline-dependent transactivators affect long-term expression of mouse erythropoietin delivered by a helper-dependent adenoviral vector", *J Gene Med* (2005).
- [301] N. TRAN, M. RAPONI, I. W. DAWES, ET G. M. ARNDT, "Control of specific gene expression in mammalian cells by co-expression of long complementary RNAs", *FEBS Lett* **573**, 127 (2004).
- [302] S. KOZAKI, Y. KAMATA, T. NAGAI, J. OGASAWARA, ET G. SAKAGUCHI, "The use of monoclonal antibodies to analyze the structure of Clostridium botulinum type E derivative toxin", *Infect Immun* **52**, 786 (1986).
- [303] S. KOZAKI, J. OGASAWARA, Y. SHIMOTE, Y. KAMATA, ET G. SAKAGUCHI, "Antigenic structure of Clostridium botulinum type B neurotoxin and its interaction with gangliosides, cerebroside, and free fatty acids", *Infect Immun* **55**, 3051 (1987).

- [304] S. KOZAKI, A. MIKI, Y. KAMATA, J. OGASAWARA, ET G. SAKAGUCHI, "Immunological characterization of papain-induced fragments of Clostridium botulinum type A neurotoxin and interaction of the fragments with brain synaptosomes", *Infect Immun* **57**, 2634 (1989).
- [305] D. B. LACY, W. TEPP, A. C. COHEN, B. R. DASGUPTA, ET R. C. STEVENS, "Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity", *Nat Struct Biol* **5**, 898 (1998).
- [306] A. RUMMEL, T. KARNATH, T. HENKE, H. BIGALKE, ET T. BINZ, "Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G", *J Biol Chem* **279**, 30865 (2004).
- [307] M. DONG, D. A. RICHARDS, M. C. GOODNOUGH, W. H. TEPP, E. A. JOHNSON, ET E. R. CHAPMAN, "Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells", *J Cell Biol* **162**, 1293 (2003).
- [308] G. J. RAINEY ET J. A. YOUNG, "Antitoxins : novel strategies to target agents of bioterrorism", *Nat Rev Microbiol* **2**, 721 (2004).
- [309] S. S. ARNON *et al.*, "Botulinum toxin as a biological weapon : medical and public health management", *Jama* **285**, 1059 (2001).
- [310] J. J. SCHMIDT ET R. G. STAFFORD, "A high-affinity competitive inhibitor of type A botulinum neurotoxin protease activity", *FEBS Lett* **532**, 423 (2002).
- [311] C. ANNE, S. TURCAUD, J. QUANCARD, F. TEFFO, H. MEUDAL, M. C. FOURNIE-ZALUSKI, ET B. P. ROQUES, "Development of potent inhibitors of botulinum neurotoxin type B", *J Med Chem* **46**, 4648 (2003).
- [312] J. C. BURNETT *et al.*, "Novel small molecule inhibitors of botulinum neurotoxin A metalloprotease activity", *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 84 (2003).
- [313] M. ADLER, J. D. NICHOLSON, F. CORNILLE, ET J. HACKLEY, B. E., "Efficacy of a novel metalloprotease inhibitor on botulinum neurotoxin B activity", *FEBS Lett* **429**, 234 (1998).
- [314] M. P. BYRNE ET L. A. SMITH, "Development of vaccines for prevention of botulism", *Biochimie* **82**, 955 (2000).
- [315] D. J. SHEDLOCK ET D. B. WEINER, "DNA vaccination : antigen presentation and the induction of immunity", *J Leukoc Biol* **68**, 793 (2000).
- [316] J. L. HALPERN, L. A. SMITH, K. B. SEAMON, K. A. GROOVER, ET W. H. HABIG, "Sequence homology between tetanus and botulinum toxins detected by an antipeptide antibody", *Infect Immun* **57**, 18 (1989).
- [317] M. A. CLAYTON, J. M. CLAYTON, D. R. BROWN, ET J. L. MIDDLEBROOK, "Protective vaccination with a recombinant fragment of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in Escherichia coli", *Infect Immun* **63**, 2738 (1995).
- [318] M. T. DERTZBAUGH ET M. W. WEST, "Mapping of protective and cross-reactive domains of the type A neurotoxin of Clostridium botulinum", *Vaccine* **14**, 1538 (1996).
- [319] T. KUBOTA, T. WATANABE, N. YOKOSAWA, K. TSUZUKI, T. INDOH, K. MORIISHI, K. SANDA, Y. MAKI, K. INOUE, ET N. FUJII, "Epitope regions in the heavy chain of Clostridium botulinum type E neurotoxin recognized by monoclonal antibodies", *Appl Environ Microbiol* **63**, 1214 (1997).
- [320] H. F. LAPENOTIERE, M. A. CLAYTON, ET J. L. MIDDLEBROOK, "Expression of a large, nontoxic fragment of botulinum neurotoxin serotype A and its use as an immunogen", *Toxicon* **33**, 1383 (1995).
- [321] D. R. BROWN, J. LLOYD, ET J. SCHMIDT, "Identification and characterization of a neutralizing monoclonal antibody against botulinum neurotoxin, serotype F, following vaccination with active toxin.", *Hybridoma* **16**, 447 (1997).
- [322] P. AMERSDORFER, C. WONG, S. CHEN, T. SMITH, S. DESHPANDE, R. SHERIDAN, R. FINNERN, ET J. D. MARKS, "Molecular characterization of murine humoral immune response to botulinum neurotoxin type A binding domain as assessed by using phage antibody libraries", *Infect Immun* **65**, 3743 (1997).
- [323] A. MAKOFF, S. BALLANTINE, A. SMALLWOOD, ET N. FAIRWEATHER, "Expression of tetanus toxin fragment C in E. coli : its purification and potential use as a vaccine.", *BioTechnology* **7**, 1043 (1989).
- [324] J. L. MIDDLEBROOK, "Protection strategies against botulinum toxin", *Adv Exp Med Biol* **383**, 93 (1995).
- [325] M. A. LIU, "DNA vaccines : a review", *J Intern Med* **253**, 402 (2003).
- [326] J. A. LEIFERT, M. P. RODRIGUEZ-CARRENO, F. RODRIGUEZ, ET J. L. WHITTON, "Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways", *Immunol Rev* **199**, 40 (2004).
- [327] R. D. WEERATNA, T. WU, S. M. EFLER, L. ZHANG, ET H. L. DAVIS, "Designing gene therapy vectors : avoiding immune responses by using tissue-specific promoters", *Gene Ther* **8**, 1872 (2001).
- [328] B. R. DE GEEST, S. A. VAN LINTHOUT, ET D. COLLEN, "Humoral immune response in mice against a circulating antigen induced by adenoviral transfer is strictly dependent on expression in antigen-presenting cells", *Blood* **101**, 2551 (2003).

- [329] C. A. TORRES, A. IWASAKI, B. H. BARBER, ET H. L. ROBINSON, "Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations", *J Immunol* **158**, 4529 (1997).
- [330] S. CASARES, K. INABA, T. D. BRUMEANU, R. M. STEINMAN, ET C. A. BONA, "Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope", *J Exp Med* **186**, 1481 (1997).
- [331] O. AKBARI, N. PANJWANI, S. GARCIA, R. TASCION, D. LOWRIE, ET B. STOCKINGER, "DNA vaccination : transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity", *J Exp Med* **189**, 169 (1999).
- [332] A. BOULOC, P. WALKER, J. C. GRIVEL, J. C. VOGEL, ET S. I. KATZ, "Immunization through dermal delivery of protein-encoding DNA : a role for migratory dendritic cells", *Eur J Immunol* **29**, 446 (1999).
- [333] M. A. CHATTERGOON, T. M. ROBINSON, J. D. BOYER, ET D. B. WEINER, "Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells", *J Immunol* **160**, 5707 (1998).
- [334] S. BABIUK, M. E. BACA-ESTRADA, M. FOLDVARI, D. M. MIDDLETON, D. RABUSSAY, G. WIDERA, ET L. A. BABIUK, "Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines", *J Biotechnol* **110**, 1 (2004).
- [335] J. RAJCANI, T. MOSKO, ET I. REZUCHOVA, "Current developments in viral DNA vaccines : shall they solve the unsolved ?", *Rev Med Virol* (2005).
- [336] J. CLAYTON ET J. L. MIDDLEBROOK, "Vaccination of mice with DNA encoding a large fragment of botulinum neurotoxin serotype A", *Vaccine* **18**, 1855 (2000).
- [337] R. H. SHYU, M. F. SHAIQ, S. S. TANG, H. F. SHYU, C. F. LEE, M. H. TSAI, J. E. SMITH, H. H. HUANG, J. J. WEY, J. L. HUANG, ET H. H. CHANG, "DNA vaccination using the fragment C of botulinum neurotoxin type A provided protective immunity in mice", *J Biomed Sci* **7**, 51 (2000).
- [338] A. M. BENNETT, S. D. PERKINS, ET J. L. HOLLEY, "DNA vaccination protects against botulinum neurotoxin type F", *Vaccine* **21**, 3110 (2003).
- [339] N. CAZEAUX, Y. BENNASSER, P. L. VIDAL, Z. LI, D. PAULIN, ET E. BAHRAOUI, "Comparative study of immune responses induced after immunization with plasmids encoding the HIV-1 Nef protein under the control of the CMV-IE or the muscle-specific desmin promoter", *Vaccine* **20**, 3322 (2002).
- [340] H. S. GARMORY, K. A. BROWN, ET R. W. TITBALL, "DNA vaccines : improving expression of antigens", *Genet Vaccines Ther* **1**, 2 (2003).
- [341] H. L. DAVIS, M. MANCINI, M. L. MICHEL, ET R. G. WHALEN, "DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen : longevity of primary response and effect of boost", *Vaccine* **14**, 910 (1996).
- [342] J. J. DONNELLY, D. MARTINEZ, K. U. JANSEN, R. W. ELLIS, D. L. MONTGOMERY, ET M. A. LIU, "Protection against papillomavirus with a polynucleotide vaccine", *J Infect Dis* **173**, 314 (1996).
- [343] N. A. DORIA-ROSE ET N. L. HAIGWOOD, "DNA vaccine strategies : candidates for immune modulation and immunization regimens", *Methods* **31**, 207 (2003).
- [344] L. FRELIN, G. AHLEN, M. ALHEIM, O. WEILAND, C. BARNFIELD, P. LILJESTROM, ET M. SALLBERG, "Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene", *Gene Ther* **11**, 522 (2004).
- [345] R. STRATFORD, G. DOUCE, L. ZHANG-BARBER, N. FAIRWEATHER, J. ESKOLA, ET G. DOUGAN, "Influence of codon usage on the immunogenicity of a DNA vaccine against tetanus", *Vaccine* **19**, 810 (2000).
- [346] M. S. ASHOK ET P. N. RANGARAJAN, "Protective efficacy of a plasmid DNA encoding Japanese encephalitis virus envelope protein fused to tissue plasminogen activator signal sequences : studies in a murine intracerebral virus challenge model", *Vaccine* **20**, 1563 (2002).
- [347] M. GEISSLER, V. BRUSS, S. MICHALAK, B. HOCKENJOS, D. ORTMANN, W. B. OFFENSBERGER, J. R. WANDS, ET H. E. BLUM, "Intracellular retention of hepatitis B virus surface proteins reduces interleukin-2 augmentation after genetic immunizations", *J Virol* **73**, 4284 (1999).
- [348] Z. Q. XIANG, S. L. SPITALNIK, J. CHENG, J. ERIKSON, B. WOJCZYK, ET H. C. ERTL, "Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus", *Virology* **209**, 569 (1995).
- [349] Z. Q. XIANG, S. SPITALNIK, M. TRAN, W. H. WUNNER, J. CHENG, ET H. C. ERTL, "Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus", *Virology* **199**, 132 (1994).
- [350] H. L. DAVIS, M. L. MICHEL, M. MANCINI, M. SCHLEEF, ET R. G. WHALEN, "Direct gene transfer in skeletal muscle : plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen", *Vaccine* **12**, 1503 (1994).

- [351] M. TAVALLAIE, A. CHENAL, D. GILLET, Y. PEREIRA, M. MANICH, M. GIBERT, S. RAFFESTIN, M. R. POPOFF, ET J. C. MARVAUD, "Interaction between the two subdomains of the C-terminal part of the botulinum neurotoxin A is essential for the generation of protective antibodies", *FEBS Lett* **572**, 299 (2004).
- [352] E. FATTORI, M. CAPPELLETTI, I. ZAMPAGLIONE, C. MENNUNI, F. CALVARUSO, M. ARCURI, G. RIZZUTO, P. COSTA, G. PERRETTA, G. CILIBERTO, ET N. LA MONICA, "Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates", *J Gene Med* **7**, 228 (2005).
- [353] M. A. BARRY ET S. A. JOHNSTON, "Biological features of genetic immunization", *Vaccine* **15**, 788 (1997).
- [354] J. S. BOYLE, C. KONIARAS, ET A. M. LEW, "Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination : cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization", *Int Immunol* **9**, 1897 (1997).
- [355] E. GRONEVIK, I. MATHIESEN, ET T. LOMO, "Early events of electroporation-mediated intramuscular DNA vaccination potentiate Th1-directed immune responses", *J Gene Med* (2005).
- [356] M. SEDEGAH *et al.*, "Reduced immunogenicity of DNA vaccine plasmids in mixtures", *Gene Ther* **11**, 448 (2004).
- [357] E. MORI, K. KOMORI, T. YAMAOKA, M. TANI, C. KATAOKA, A. TAKESHITA, M. USUI, K. EGASHIRA, ET K. SUGIMACHI, "Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits", *Circulation* **105**, 2905 (2002).
- [358] S. NISHIKAGE, H. KOYAMA, T. MIYATA, S. ISHII, H. HAMADA, ET H. SHIGEMATSU, "In vivo electroporation enhances plasmid-based gene transfer of basic fibroblast growth factor for the treatment of ischemic limb", *J Surg Res* **120**, 37 (2004).
- [359] B. M. MEDI, S. HOSELTON, R. B. MAREPALLI, ET J. SINGH, "Skin targeted DNA vaccine delivery using electroporation in rabbits. I : efficacy", *Int J Pharm* **294**, 53 (2005).
- [360] W. W. NICHOLS, B. J. LEDWITH, S. V. MANAM, ET P. J. TROILO, "Potential DNA vaccine integration into host cell genome", *Ann N Y Acad Sci* **772**, 30 (1995).
- [361] B. J. LEDWITH *et al.*, "Plasmid DNA vaccines : assay for integration into host genomic DNA", *Dev Biol (Basel)* **104**, 33 (2000).
- [362] B. J. LEDWITH, S. MANAM, P. J. TROILO, A. B. BARNUM, C. J. PAULEY, N. GRIFFITHS, T. G., L. B. HARPER, C. M. BEARE, W. J. BAGDON, ET W. W. NICHOLS, "Plasmid DNA vaccines : investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice", *Intervirology* **43**, 258 (2000).
- [363] S. MANAM *et al.*, "Plasmid DNA vaccines : tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA", *Intervirology* **43**, 273 (2000).
- [364] T. MARTIN, S. E. PARKER, R. HEDSTROM, T. LE, S. L. HOFFMAN, J. NORMAN, P. HOBART, ET D. LEW, "Plasmid DNA malaria vaccine : the potential for genomic integration after intramuscular injection", *Hum Gene Ther* **10**, 759 (1999).
- [365] E. K. HUI, P. C. WANG, ET S. J. LO, "Strategies for cloning unknown cellular flanking DNA sequences from foreign integrants", *Cell Mol Life Sci* **54**, 1403 (1998).
- [366] R. H. WATERSTON *et al.*, "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome", *Nature* **420**, 520 (2002).
- [367] P. D. SIEBERT, A. CHENCHIK, D. E. KELLOGG, K. A. LUKYANOV, ET S. A. LUKYANOV, "An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA", *Nucleic Acids Res* **23**, 1087 (1995).
- [368] D. SPERTINI, C. BELIVEAU, ET G. BELLEMARE, "Screening of transgenic plants by amplification of unknown genomic DNA flanking T-DNA", *Biotechniques* **27**, 308 (1999).
- [369] R. H. DON, P. T. COX, B. J. WAINWRIGHT, K. BAKER, ET J. S. MATTICK, "'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification", *Nucleic Acids Res* **19**, 4008 (1991).
- [370] M. AILENBERG ET M. SILVERMAN, "Controlled hot start and improved specificity in carrying out PCR utilizing touch-up and loop incorporated primers (TULIPS)", *Biotechniques* **29**, 1018 (2000).
- [371] M. SCHMIDT, G. HOFFMANN, M. WISSLER, N. LEMKE, A. MUSSIG, H. GLIMM, D. A. WILLIAMS, S. RAGG, C. U. HESEMANN, ET C. VON KALLE, "Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples", *Hum Gene Ther* **12**, 743 (2001).
- [372] Z. WANG *et al.*, "Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation", *Gene Ther* **11**, 711 (2004).
- [373] F. PAILLARD, "Promoter attenuation in gene therapy : causes and remedies.", *Human Gene Therapy* **8**, 2009 (1997).

- [374] J. F. COSTELLO ET C. PLASS, "Methylation matters", *J Med Genet* **38**, 285 (2001).
- [375] R. MEEHAN, J. LEWIS, S. CROSS, X. NAN, P. JEPPESEN, ET A. BIRD, "Transcriptional repression by methylation of CpG", *J Cell Sci Suppl* **16**, 9 (1992).
- [376] S. PROSCH, J. STEIN, K. STAAK, C. LIEBENTHAL, H. D. VOLK, ET D. H. KRUGER, "Inactivation of the very strong HCMV immediate early promoter by DNA CpG methylation in vitro", *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**, 195 (1996).
- [377] M. CURRADI, A. IZZO, G. BADARACCO, ET N. LANDSBERGER, "Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation", *Mol Cell Biol* **22**, 3157 (2002).
- [378] J. NEWELL-PRICE, A. J. CLARK, ET P. KING, "DNA methylation and silencing of gene expression", *Trends Endocrinol Metab* **11**, 142 (2000).
- [379] A. R. BROOKS, R. N. HARKINS, P. WANG, H. S. QIAN, P. LIU, ET G. M. RUBANYI, "Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle", *J Gene Med* **6**, 395 (2004).
- [380] K. HONG, J. SHERLEY, ET D. A. LAUFFENBURGER, "Methylation of episomal plasmids as a barrier to transient gene expression via a synthetic delivery vector", *Biomol Eng* **18**, 185 (2001).
- [381] E. J. OAKELEY, "DNA methylation analysis : a review of current methodologies", *Pharmacol Ther* **84**, 389 (1999).
- [382] S. J. CLARK, J. HARRISON, C. L. PAUL, ET M. FROMMER, "High sensitivity mapping of methylated cytosines", *Nucleic Acids Res* **22**, 2990 (1994).
- [383] A. C. JENKE, M. F. SCINTEIE, I. M. STEHLE, ET H. J. LIPPS, "Expression of a transgene encoded on a non-viral episomal vector is not subject to epigenetic silencing by cytosine methylation", *Mol Biol Rep* **31**, 85 (2004).
- [384] J. KOMURA, T. OKADA, ET T. ONO, "Repression of transient expression by DNA methylation in transcribed regions of reporter genes introduced into cultured human cells", *Biochim Biophys Acta* **1260**, 73 (1995).
- [385] L. QIN, Y. DING, D. R. PAHUD, E. CHANG, M. J. IMPERIALE, ET J. S. BROMBERG, "Promoter attenuation in gene therapy : interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression", *Hum Gene Ther* **8**, 2019 (1997).
- [386] Y. X. CHEN, C. E. KRULL, ET L. W. RENEKER, "Targeted gene expression in the chicken eye by in ovo electroporation", *Mol Vis* **10**, 874 (2004).

Publications

Ce travail a donné lieu à l'écriture de trois articles (un publié, un accepté pour publication et un soumis), une revue et un brevet.

- 1** **C. Trollet**, M. Ibañez-Ruiz, C. Bloquel, G. Valin, D. Scherman, P. Bigey. Regulation of gene expression using a conditional RNA antisense strategy. *J. Genome Sci. Tech.* 2004, 3, 1-13.
- 2** A. Rubenstrunk, **C. Trollet**, C. Orsini, D. Scherman, Positive in vivo heterologous gene regulation by electric pulses delivery with metallothionein I gene promoter. *accepté pour publication dans The Journal of Gene Medicine.*
- 3** C. Bloquel*, **C. Trollet***, E. Pradine, J. Seguin, D. Scherman, M. Bureau, Non invasive quantification of gene transfer by optical imaging in mouse muscle and knee after electrotransfer with a luciferase encoding plasmid. *soumis* (* contribution égale)
- 4** **C. Trollet**, P. Bigey, D. Scherman, Electrotransfection-an overview. *DNA pharmaceuticals-Schleef (Ed), sous presse.*
- 5** BREVET CNRS n°64386 : **C. Trollet**, P. Bigey, Y. Pereira, M. Popoff, D. Scherman, Obtention d'antisérums par immunisation génétique

Résumé

Transfert de gène *in vivo* : étude, régulation et application de l'électrotransfert.

L'électrotransfert est une technique de transfert de gène *in vivo*, permettant une expression élevée du transgène dans un grand nombre de tissus. Dans ce contexte, nous avons utilisé l'imagerie optique pour optimiser différents protocoles d'électrotransfert dans le muscle et la peau. Nous avons développé un système de régulation de l'expression des gènes combinant le système de régulation répressible à la tétracycline Tet-Off et une stratégie antisens. Nous avons examiné le potentiel de l'électrotransfert d'ADN plasmidique pour l'obtention d'anticorps neutralisants à haut titre contre les toxines botuliques A, B et E. Les animaux immunisés avec des plasmides codant les fragments immunogènes des toxines expriment de façon endogène ces fragments de toxines, qui servent d'antigènes et déclenchent une réponse immune. Nous avons finalement étudié l'état de méthylation de l'ADN plasmidique après injection et électrotransfert dans le muscle squelettique et sa possible intégration dans le génome.

Mots-clés: transfert de gène non viral, électrotransfert, imagerie optique, régulation de l'expression génétique, immunisation génétique, intégration, méthylation.

Abstract

Study, regulation and application of *in vivo* gene transfer by electrotransfer.

We have been dealing with different projects using a physical method of *in vivo* gene transfer, called electrotransfer, widely used in mouse muscle and skin with high gene expression.

By *in vivo* optical imaging, we have been working on optimization of electrotransfer. We have developed an artificial regulation system to *in vivo* control an exogenous gene expression based on the antisense technology using muscular electrotransfer in mouse. We have worked on molecular optimization of DNA electrotransfer for genetic immunization for botulinum antigen screening. This kind of DNA immunization has been used to induce antibodies production in mouse and rabbit. We have been studying the methylation status and the reasons for persistence of plasmid DNA in muscle cells after electrotransfer since intramuscularly injected and electrotransferred plasmid DNA leads to a persisting expression for more than a year.

Keywords: non viral gene transfer, electrotransfer, optical imaging, regulation of gene expression, genetic immunisation, integration, methylation

Discipline

Activité biologique des substances naturelles. Reconnaissance moléculaire et communication cellulaire.

Laboratoire

Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique

INSERM U640 CNRS UMR8151

Université René Descartes, 4, avenue de l'observatoire, 75006 Paris